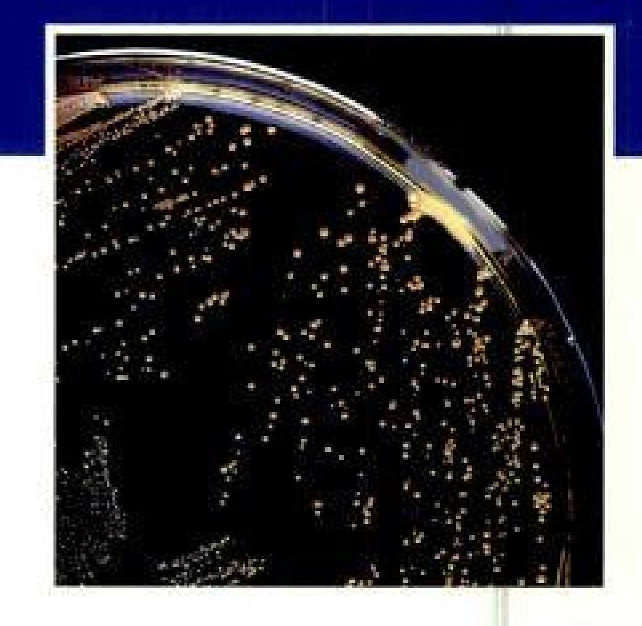


BIOSCIENCES ET TECHNIQUES
Collection dirigée par J. Figarella et A. Calas

2e édition



A. Meyer, J. Deiana, A. Bernard

Cours de microbiologie générale

avec problèmes et exercices corrigés

doin

Copyrighted material

BIOSCIENCES
ET TECHNIQUES
Collection dirigée
par J. Figarella et A. Calas

Cours de microbiologie générale
avec problèmes et exercices corrigés

Alphonse Meyer
Professeur agrégé de Biochimie-Génie biologique
LPO Jean Rostand, Strasbourg

José Deiana
Professeur de Biochimie-Génie biologique
LPO Jean Rostand, Strasbourg

Alain Bernard
Directeur des études
Département de Génie biologique
IUT Louis Pasteur, Schiltigheim

2e édition

doin



Copyrighted material

Avertissement

Cet ouvrage, parfaitement adapté au programme des BTS Biotechnologie, Bioanalyses et Contrôles, Analyses Biologiques, Métiers de l'eau, Qualité dans les industries alimentaires et les bio-industries des DUT de biologie appliquée, ainsi qu'à ceux des classes préparatoires aux grandes écoles (type TB), s'adresse tout d'abord aux étudiants de ces sections.

Les élèves des classes terminales de baccalauréat technologique série STL (Sciences et Techniques de Laboratoire) spécialité « Biochimie – Génie Biologique » y trouveront tous les éléments de leur programme avec, à la fin de chaque chapitre du cours, des questions reprenant les compétences attendues par le programme leur permettant de tester leurs connaissances.

Le cours sert de base à la résolution des exercices et des problèmes répertoriés, avec leurs corrigés à la fin de chaque chapitre, dont la plupart sont accessibles aux bacheliers.

Les parties en caractères de taille normale correspondent aux connaissances fondamentales, indispensables pour la réussite aux examens.

Les compléments en caractères plus petits sont des approfondissements et des compléments aux programmes des BTS, des DUT, des classes préparatoires aux grandes écoles (types TB), des DEUG et des licences du secteur biologie.

À la fin de chaque chapitre du cours, des questions correspondent aux compétences attendues par les programmes, des exercices et des problèmes avec leurs corrigés permettent de conforter les connaissances sur lesquelles les candidats sont susceptibles d'être interrogés.

Cette nouvelle édition est à la fois le fruit d'une réactualisation des connaissances de microbiologie, d'une adaptation à la rénovation des programmes des diverses sections ayant un enseignement de microbiologie, d'une fusion du cours avec les exercices et problèmes et, enfin, une adaptation à la didactique de la microbiologie au vu de l'expérience pédagogique après plus de 30 ans d'enseignement.

Dans un volume raisonnable, l'essentiel de la microbiologie, avec une volonté marquée de ne pas oublier l'épistémologie, est présenté. L'utilisation de cet ouvrage peut se faire en autonomie et, à cet égard, les paragraphes « Savez-vous votre cours ? » ainsi que les exercices permettront à l'étudiant de tester ses connaissances.

Cependant, l'utilisation en classe sous la direction du professeur me paraît la plus judicieuse, car la volonté de limiter le volume du livre conduit forcément à des réductions qui peuvent entraîner, chez certains, des difficultés d'assimilation.

Une mention particulière pour deux chapitres me paraît indispensable :

– le métabolisme microbien est trop souvent négligé alors qu'il est extrêmement important pour le micro-organisme. Il faut arrêter de considérer la microbiologie comme antinomique de la biochimie – les deux disciplines sont complémentaires, pour ne pas dire symbiotiques – et voir tous les bénéfices que l'on peut tirer d'une bonne connaissance des micro-organismes surtout dans les applications industrielles ou agroalimentaires ;

– les risques biologiques sont de plus en plus présents dans la réglementation et dans notre quotidien, une application consciente et volontaire devient indispensable. Il faut comprendre les injonctions de sécurité pour les appliquer avec efficacité (les problèmes liés aux infections nosocomiales sont une illustration de cette ignorance du monde microbien).

Enfin un bon microbiologiste sera celui qui, à l'instar du bon berger, connaît bien ses « microbes », les apprécie, car il aura compris toute la diversité et la complexité de ces êtres qui, même s'ils ne sont que de petites sphères ou des bâtonnets invisibles à l'œil nu, dégagent une fantastique richesse, pas seulement biochimique. Cela en fait des êtres aussi sympathiques que les moutons du berger malgré les quelques loups qui se cachent dans la… biosphère.

A. Meyer

DOIN ÉDITEURS
Groupe Liaisons SA
1, avenue Edouard-Belin
92856 Rueil-Malmaison Cedex

© 2004 Doin Éditeurs
ISBN 2-7040-1170-2
ISSN 1629-7954

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (Loi du 11 mars 1957 – art. 40 et 41 et Code Pénal art. 425).
Toutefois, des photocopies peuvent être réalisées avec l'autorisation de l'éditeur. Celle-ci pourra être obtenue auprès du Centre Français du Copyright, 20 rue des grands-Augustins – 75006 PARIS, auquel DOIN a donné mandat pour le représenter auprès des utilisateurs.

Imprimé en France

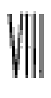
Copyrighted material

Table des matières

Copyrighted material

Chapitre 4 : Métabolisme

Copyrighted material



Copyrighted material

Chapitre 7 : Micro-organismes et milieu

Copyrighted material

Chapitre 8 : Virologie

Chapitre 9 : Les risques biologiques et la sécurité microbiologique

Copyrighted material

Tableau des abréviations des genres microbiens utilisées dans cet ouvrage

Abréviations	Micro-organismes	Abréviations	Micro-organismes
A.	*Aspergillus*	*Ps.*	*Pseudomonas*
B.	*Bacillus*	*Pe.*	*Penicillium*
Cl.	*Clostridium*	*Pr.*	*Proteus*
C.	*Corynebacterium*	*St.*	*Staphylococcus*
Ca.	*Candida*	*Str.*	*Streptococcus*
D.	*Desulfovibrio*	*S.*	*Salmonella*
E.	*Escherichia*	*Sh.*	*Shigella*
H.	*Haemophilus*	*Stm.*	*Streptomyces*
K.	*Klebsiella*	*Sc.*	*Saccharomyces*
L.	*Lactobacillus*	*T.*	*Thiobacillus*
M.	*Mycobacterium*	*V.*	*Vibrio*
My.	*Mycoplasma*	*Y.*	*Yersinia*
P.	*Paracoccus*		

Copyrighted material

Chapitre 1

Les microbes parmi nous

Depuis la plus haute Antiquité, les micro-organismes ont été utilisés empiriquement pour produire et conserver les aliments : la découverte du vin, par Noé selon la Bible ou par Dionysos selon les Grecs, témoigne d'une tradition remontant vraisemblablement à la préhistoire. De même, la fabrication des laits fermentés et des fromages a été pratiquée depuis des millénaires dans les différentes régions du globe. Il s'agissait dans tous les cas de procédés permettant la conservation d'aliments hautement putrescibles comme le lait ou de productions saisonnières comme les jus de fruits.

1. Histoire de la microbiologie

1.1. Origines

La découverte des micro-organismes nécessitait la fabrication d'un « outil ». C'est le Hollandais **Antony Van Leeuwenhoek** (1632-1723) qui conçut le microscope le plus simple, c'est-à-dire la loupe. Il s'agissait d'une lentille biconvexe maintenue entre deux plaques de métal, avec un assemblage ingénieux permettant de déplacer l'objet et de faire une mise au point. Les lentilles les plus fortes avaient un grandissement d'environ 270. Observateur génial, Van Leeuwenhoek révéla au monde scientifique la prodigieuse diversité des micro-organismes et l'incroyable richesse des milieux naturels, comme l'eau, en protozoaires, algues, levures, bactéries. Dans des échantillons d'eau de rivière, des décoctions de foin ou encore dans de la salive, Van Leeuwenhoek décrivit le grouillement d'une infinie variété d'**animalcules** mobiles ou immobiles, en forme de sphère, de bâtonnet, de spirille, etc. Il put faire des comparaisons précises entre ces micro-organismes et des hématies ou des grains de sable. Ses magnifiques descriptions sont d'une précision telle qu'aujourd'hui encore, elles forcent l'admiration et permettent l'identification. Cependant, la physiologie de ces organismes ne fut ni élucidée ni comprise. Ce n'est qu'en 1836 que fut véritablement interprétée la nature biologique des fermentations.

1.2. Époque pastorienne

1.2.1. Fermentations

L'essor de la microbiologie au cours de la seconde moitié du XIXe siècle a été déclenché puis dominé par le génie de **Louis Pasteur** (1822-1895).

Copyrighted material

Formé à la physique et à la chimie, Pasteur, dès l'âge de 24 ans, découvre l'**asymétrie moléculaire** de l'acide tartrique, pressentant qu'elle constitue l'une des propriétés caractéristiques et fondamentales de la matière vivante. En 1854, alors qu'il est doyen de la faculté des sciences de Lille, il entreprend l'étude de la **fermentation lactique**. Il présente en 1857 son fameux mémoire où il décrit le ferment lactique comme un organisme vivant, globuleux, beaucoup plus petit que la levure.

Pendant 20 ans, il poursuit inlassablement ses travaux sur d'autres fermentations (alcoolique en 1858, butyrique en 1861, acétique…) et sur les maladies qui les affectent. Ces maladies sont dues à des contaminants que l'on peut détruire par chauffage à 56 °C, procédé universellement connu sous le nom de **pasteurisation**.

1.2.2. Génération spontanée

C'est à cette époque que Pasteur réfute les thèses en cours sur la **génération spontanée** (selon laquelle les « animalcules » provenaient de la transformation de la matière organique) en montrant la présence de germes dans l'atmosphère, leur destruction par la chaleur (stérilisation) et leur rétention dans ses fameux ballons à col-de-cygne. Les organismes et les micro-organismes ne peuvent donc apparaître spontanément, comme on le croyait à l'époque, mais ils existent autour de nous dans l'air, l'eau, la terre ; leur activité peut se révéler utile (fermentation) ou nuisible (maladies).

1.2.3. Bactériologie médicale

Louis Pasteur et **Robert Koch** (1843-1910) sont les véritables fondateurs de la **bactériologie médicale** où la théorie des germes trouve une nouvelle forme en même temps qu'une nouvelle vigueur.

Koch puis Pasteur démontrent de manière irréfutable que la bactéridie observée par Rayer et Davaine dans le sang des animaux charbonneux est l'agent responsable *(B. anthracis)* du charbon épidémique. Dans un célèbre mémoire, Koch énonce les fameuses règles connues sous le nom de **postulats de Koch**. Pour démontrer qu'un micro-organisme est responsable d'une maladie, il faut :

– qu'il soit retrouvé dans tous les cas de maladies semblables ;

– qu'il soit isolé en cultures pures ;

– qu'il reproduise la maladie expérimentalement ;

– qu'il soit à nouveau isolé à partir d'animaux infectés expérimentalement.

C'est à Koch et ses collaborateurs (comme Erlich, Gaffky, Nocard, etc.) que l'on doit aussi d'avoir mis au point et porté d'emblée à un état de perfection incomparable toutes les techniques d'isolement et d'identification des bactéries *(tab. I.1)*.

À la même époque, le chirurgien anglais **Joseph Lister** (1827-1912), à partir des travaux de Pasteur, met au point la technique d'**asepsie** chirurgicale.

1.2.4. Vaccinations

Poussé par un souci humanitaire, Pasteur se préoccupe de protéger l'homme contre les maladies infectieuses. L'étude du choléra des poules lui donne l'occasion de cultiver l'agent responsable et de l'atténuer : les poules inoculées avec ce « virus » atténué résistent à l'injection d'une culture virulente. La **vaccination** est née. Cette théorie des vaccinations devait trouver une année plus tard une éclatante confirmation avec le charbon. Pasteur et ses collaborateurs, Chamberland, Roux et Thuillier, mettent au point un procédé d'atténuation du bacille, qui devient alors vaccinant. Au cours de l'**expérience de Pouilly le Fort**, un troupeau composé de 24 moutons, 6 vaches et 1 chèvre est inoculé avec une souche vaccinale, 12 jours plus tard avec une culture moins atténuée puis, après un délai de 15 jours, avec une souche hautement virulente. Le résultat est spectaculaire puisque tous les animaux vaccinés sont en parfaite santé tandis que les témoins sont pour la plupart morts.

La prévention de la **rage** est la dernière grande œuvre de Pasteur. En dépit de l'impossibilité d'isoler l'agent responsable (virus) et malgré la complexité de la maladie, Pasteur peut mettre au point des préparations de moelle de lapin

Copyrighted material

Tableau I.1 – Principales étapes et découvertes de la microbiologie.

Découvertes	Auteurs	Date
– Premier microscope	Van Leeuwenhoek	1715
– La fermentation alcoolique dans le traité élémentaire de chimie	Lavoisier	1789
– Utilisation de la vaccine pour se protéger de la variole	Jenner	1796
– Mise au point d'une technique utilisant la chaleur (« appertisation ») permettant la conservation des aliments	Nicolas Appert	1809
– Étude qualitative et quantitative de la fermentation alcoolique (complétant les études de Lavoisier)	Gay-Lussac	1815
– Nature biologique des fermentations	Cagniard-Latour (France) Schwann et Kutzing (Allemagne)	1836
– L'asymétrie moléculaire (acide tartrique)	Pasteur	1846
– Agent de la maladie du charbon épidémique et rôle des micro-organismes dans la genèse des maladies	Rayer et Davaine	1850
– Fermentation lactique	Pasteur	1857
– Étude de la fermentation alcoolique	Pasteur	1858
– Mise en évidence des germes dans l'atmosphère	Pasteur	1859
– La fermentation butyrique - l'anaérobiose	Pasteur	1861
– Études sur le vinaigre	Pasteur	1861-64
– Antisepsie chirurgicale, asepsie	Lister	1865
– Étude sur le vin	Pasteur	1866
– Acides nucléiques	Mischer	1868
– Techniques de fixation et de coloration des bactéries	Koch	1875
– Étude sur la bière	Pasteur	1876
– Stérilisation par la chaleur humide sous pression (autoclave)	Pasteur et Chamberland	1877
– Spores, application aux méthodes de stérilisation – Tyndallisation	Tyndall	1877
– Choléra des poules, immunisation par des cultures atténuées	Pasteur	1880
– Vaccination anti-charbonneuse – expérience publique de Pouilly-le-Fort	Pasteur	1881
– Méthodes d'isolement sur milieu solide	Koch	1881
– Études sur le rouget du porc	Pasteur	1882
– *Mycobacterium tuberculosis*	Koch	1882
– Emploi de l'agar	Mme Hesse	1882
– *Vibrio cholerae*	Koch	1883
– Vaccination contre la rage	Pasteur	1884
– Méthode de coloration différentielle des bactéries	Gram	1884
– *Corynebacterium diphteriae*	Loeffler	1884
– *Salmonella typhi*	Gaffky	1884
– Staphylocoques et Streptocoques	Rosenbach	1884
– Application du traitement antirabique à l'homme	Pasteur	1885
– *E. coli*	Escherich	1885
– Boîte dite de Pétri	Petri	1887

Copyrighted material

Tableau I.1 – Principales étapes et découvertes de la microbiologie (suite).

Découvertes	Auteurs	Date
– *Neisseria meningitidis*	Weichselbaum	1887
– Bactéries fixatrices de l'azote et symbiotiques des légumineuses	Beijerlnck	1888
– *Clostridium tetani*	Kitasato	1889
– Bactéries nitrifiantes du sol, nature biologique de la nitrification	Winogradsky	1890
– *Clostridium perfringens*	Welch et Nuttall	1892
– *Yersinia pestis*	Yersin et Kitasato	1894
– Bactéries réductrices des sulfates	Beijerlnck	1895
– Rôle des enzymes dans le pouvoir fermentaire	Buchner	1897
– *Clostridium botulinum*	Van Ermengen	1897
– Existence des virus	Beijerlnck	1898
– *Shigella dysenteriae*	Shiga	1898
– Vaccin antitétanique		1914
– Les bactériophages	Twort	1915
– Vaccin contre la tuberculose BCG	Calmette et Guérin	1920
– Transformation des pneumocoques	Griffith	1928
– Les anatoxines	Ramon	1930
– Cristallisation du virus de la mosaïque du tabac	Stanley	1935
– Pénicilline : la reconnaissance de son rôle antibiotique et sa production industrielle	Florey, Chain, Heatley	1940-45
– L'ADN est le support des caractères génétiques	Avery, Mac Leod, Mac Carty	1944
– Recombinaisons génétiques	Lederberg et Tatum	1946
– Transduction	Zinder et Lederberg	1952
– Schéma général de la conformation spatiale de l'ADN	Watson et Crick	1953
– Théorie du code génétique	Gamow et par Watson et Crick	1954
– Publication des travaux sur « l'opéron lactose »	François Jacob et Jacques Monod	1961
– Structure en double hélice de l'ADN (Prix Nobel)	Crick et Watson	1962
– Travaux de l'École française de biologie moléculaire ; Institut Pasteur prix Nobel	Jacob, Monod et Lwoff	1965
– Théorie des gènes	Carlson	1966
– Mise au point des techniques de manipulation génétique	Cohen, Chang, Boyer, Helling	1973
– Expression d'un gène dans une bactérie		1974
– Vaccin contre l'hépatite B		1980
– Séquençage du génome du virus du SIDA		1984
– Séquencage du chromosome III de la levure		1991

atténuées : c'est le **virus fixé**. Du 7 au 16 juillet 1885, un enfant alsacien de 9 ans, Joseph Meister, mordu par un chien enragé, reçoit les suspensions vaccinales qui le sauvent de la maladie. L'enthousiasme qui accueille cet événement est immense.

Les travaux de cette époque sont aussi à l'origine de l'**immunologie**, science nouvelle où **Metchnikoff** (1845-1916) établit les bases de l'**immunité cellulaire** en découvrant la phagocytose. Behring et Kitasato, à la même époque, montrent que l'organisme dispose d'autres moyens de défense : c'est l'**immunité humorale**. Le terme « virus » utilisé par Pasteur désignait tout agent pathogène quel qu'il soit. En 1892, **Iwanowski** établit que la mosaïque du tabac est due à un agent

Copyrighted material

« filtrant » donc différent des bactéries retenues par les filtres. La **virologie** est née.

La **parasitologie** se développe en parallèle avec, par exemple, Laveran qui démontre que la transmission du protozoaire de la malaria est due à une mouche.

1.3. Période moderne

Les micro-organismes se reproduisent rapidement et sont faciles à cultiver. Ils donnent naissance à des populations énormes à la suite d'un grand nombre de générations successives. Dans ces conditions, ils constituent un outil particulièrement favorable en **génétique**, la science qui a pour objet l'étude des caractères héréditaires et de leurs variations. Une étape essentielle marque l'année 1944, **Avery, McLeod** et **McCarty** montrent que, dans le phénomène de transformation découvert par Griffith 16 ans auparavant, c'est l'ADN qui est responsable en étant le support des caractères héréditaires de la cellule. On apportait, pour la première fois, la démonstration éclatante du rôle de l'ADN dans l'hérédité. Les découvertes se succèdent :

– les **recombinaisons génétiques** par **Lederberg** et **Tatum** en 1946 ;

– la **transduction** par **Zinder** et **Lederberg** en 1952 ;

– le modèle de **structure de l'ADN** par **Watson** et **Crick** en 1953, et la découverte de la structure en double hélice en 1962 ;

– la signification du **codon** TTT par **Nirenberg** en 1961 et l'ensemble du **code génétique** en 1966 ;

– la dynamique de la **traduction** (avec les divers types d'ARN) et la régulation des gènes par **Jacob** et **Monod** dans les années 1960.

La **biologie moléculaire** est née de la convergence de la génétique et de la biochimie. Elle s'intéresse à la structure des macromolécules, en particulier celle des acides nucléiques et des protéines, et à leurs relations fécondes, la synthèse des protéines étant gouvernée par des gènes. La microbiologie fournit à la biologie moléculaire l'essentiel de son matériel d'étude. Grâce aux bactéries, il a été possible de connaître le mécanisme de la synthèse protéique, de décrypter le code génétique et d'analyser les mécanismes de **régulation cellulaire** qui harmonisent le potentiel génétique aux besoins de l'organisme.

La période actuelle est marquée par l'essor du **génie génétique** et des **biotechnologies**. Le génie génétique représente sans nul doute l'une des activités les plus originales et les plus révolutionnaires du XXe siècle. Il consiste à mettre en œuvre, *in vitro*, des recombinaisons génétiques, véritables greffes entre deux molécules d'ADN. La cellule bactérienne qui reçoit ainsi une information nouvelle (d'une autre bactérie ou d'une cellule animale) devient capable de produire la substance dont on lui a confié le programme (la première expression d'un gène cloné dans une bactérie date de 1974). Ces techniques suscitent d'immenses espoirs dans la production bactérienne d'hormones (clonage de l'interféron alpha en 1980), de facteurs de coagulation, d'enzymes. L'agriculture sera, dans les prochaines décennies, considérablement transformée par la création de plantes ayant des propriétés nouvelles. Il est envisagé, par exemple, de transformer certains végétaux (légumineuses) en leur permettant de fixer l'azote atmosphérique sans l'intermédiaire des symbioses bactériennes.

Des craintes quant à la possible dissémination d'organismes recombinés porteurs de gènes hautement dangereux pour l'humanité et l'environnement furent exprimées à la conférence d'Asilomar (USA) en 1975 et donnèrent lieu à discussion. Devant le danger potentiel, des règles de sécurité très strictes furent édictées ; elles ont été depuis considérablement allégées.

Ces « percées » biologiques sont fécondes pour de nombreuses applications, que ce soit sur le versant industriel ou sur ceux de la santé publique, de la pharmacologie, de l'agronomie. Les biotechnologies font référence aux applications variées qui résultent de l'utilisation de ces capacités biologiques nouvelles. Tels sont les **« bioréacteurs »** enzymatiques qui assurent le fonctionnement des enzymes en phase « immobilisée », les fermentations industrielles, la lutte biologique, la production de biomasse, de biocombustibles, etc.

L'application à l'homme posera d'autres problèmes que la bioéthique devra maîtriser.

Copyrighted material

2.1. Classification contemporaine

Avant la découverte des micro-organismes (plusieurs centaines de milliers d'espèces connues actuellement), tous les êtres vivants étaient classés à l'intérieur du règne animal ou du règne végétal. Les organismes animaux tirent leur énergie de l'oxydation de matériaux organiques, accumulent des substances de réserve sous forme de graisses ou de glycogène, sont animés de mouvements actifs ; ils sont aussi dépourvus de parois cellulaires. Les végétaux, au contraire, sont photosynthétiques, utilisant la lumière comme source d'énergie ; ils synthétisent de l'amidon comme réserve nutritive, sont dépourvus de mouvements et possèdent une paroi cellulaire.

La découverte de nouvelles formes vivantes microscopiques rendait de plus en plus difficile leur classement dans le règne animal ou végétal. Parmi elles, les algues et les champignons pouvaient être rapprochés des plantes ; les protozoaires mobiles et non photosynthétiques étaient plutôt considérés comme des animaux ; la place des bactéries restait à fixer.

En 1886, le zoologiste allemand Haecke proposa une solution logique en demandant la création, pour ces formes microscopiques, d'un troisième règne, celui des **protistes**, qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries. On donne indistinctement le nom de **protiste** ou de **microbe** (de *micro* : petit et *bios* : vie) aux organismes unicellulaires ou multicellulaires qui sont dénués de différenciation cellulaire, c'est-à-dire dont les cellules végétatives sont toutes équivalentes et ne présentent aucune spécialisation fonctionnelle. La cellule bactérienne, par exemple, est un organisme complet, indépendant, doué d'un pouvoir autonome de reproduction.

La classification biologique contemporaine pourrait alors être résumée comme suit :

– I, plantes (vasculaires et bryophytes) ;
– II, animaux ou métazoaires ;
– III, protistes (supérieurs et inférieurs) ;
– IV, virus (organismes non cellulaires).

Les virus sont totalement différents des protistes. Ils doivent être considérés « à part ». Comme le précise Lwoff, « les virus sont les Virus ». Une particule virale possède des propriétés entièrement distinctes de celles de la bactérie et, *a fortiori*, beaucoup plus éloignées encore de celles des cellules animales ou végétales.

Les protistes sont traditionnellement divisés en deux grandes classes :

– I, protistes supérieurs ou eucaryotes :
  - algues (excepté les algues bleu-vert),
  - protozoaires,
  - champignons ;
– II, protistes inférieurs ou procaryotes :
  - algues bleu-vert ou cyanophycées ou schizophycées,
  - bactéries ou schizomycètes.

Très récemment, des organismes qui n'appartiennent à aucune de ces catégories fondamentales ont été découverts. Ils ressemblent extérieurement aux bactéries mais, phylogénétiquement, ils ne sont ni procaryotes, ni eucaryotes. Ces bactéries ont été appelées **archéobactéries** parce que l'on pense qu'elles sont très anciennes. Elles sont, de fait, particulièrement adaptées aux conditions extrêmes qui ont dû exister au début de la vie terrestre. Elles formeraient alors une troisième classe de protistes.

La **microbiologie** est la science qui a pour objet l'étude des protistes ou des microbes, c'est-à-dire qu'elle englobe théoriquement non seulement la **bactériologie** mais aussi la **parasitologie**, la **mycologie**, etc. En fait, mais à tort, elle est le plus souvent restreinte à la bactériologie.

2.2. Cellule eucaryote et cellule procaryote

Les divers groupes d'organismes vivants doivent être étudiés par rapport à leur unité de structure, la cellule. En 1937 le protozoologiste Édouard Chatton proposa les termes

Copyrighted material

« eucaryote » et **« procaryote »**, mais la vraie nature de ces deux types cellulaire ne fut clairement précisée que vers 1955 avec les progrès de la microscopie électronique. On distingue, en effet, la cellule eucaryote, caractéristique des plantes, des animaux, des protistes supérieurs, et la cellule procaryote, caractéristique des protistes inférieurs, en particulier des bactéries *(fig. I.1 et I.2)*. La cellule eucaryote comprend un « vrai » noyau entouré d'une enveloppe nucléaire et contenant deux jeux semblables de chromosomes (homologues). Elle est **diploïde**. Son cytoplasme, siège des activités métaboliques de dégradation et de synthèse, est constitué d'un milieu homogène, le hyaloplasme, dans lequel baigne un grand nombre d'organites cellulaires : réticulum endoplasmique, mitochondries, appareil de Golgi, lysosomes, peroxysomes, etc. *(tab. I.2)*.

La cellule procaryote ne possède pas un « vrai » noyau mais un appareil nucléaire diffus, non isolé par une membrane, avec en général un seul chromosome *(tab. I.3)*. Elle est dite **haploïde**. Le cytoplasme contient des éléments figurés en nombre réduit, les ribosomes, et des inclusions ou substances de réserve.

Les études phylogénétiques fondées sur l'analyse des séquences nucléotidiques de l'ARN ribosomal ont confirmé l'existence d'une troisième forme cellulaire : l'**archéobactérie**. Proche de la cellule bactérienne (procaryote) par sa taille, son appareil nucléaire diffus et son cytoplasme, elle est pourtant originale par ses composants de paroi et de membrane, l'absence de thymine dans les ARN de transfert et la structure des sous-unités de l'ARN polymérase de dégradation et de synthèse.

Copyrighted material

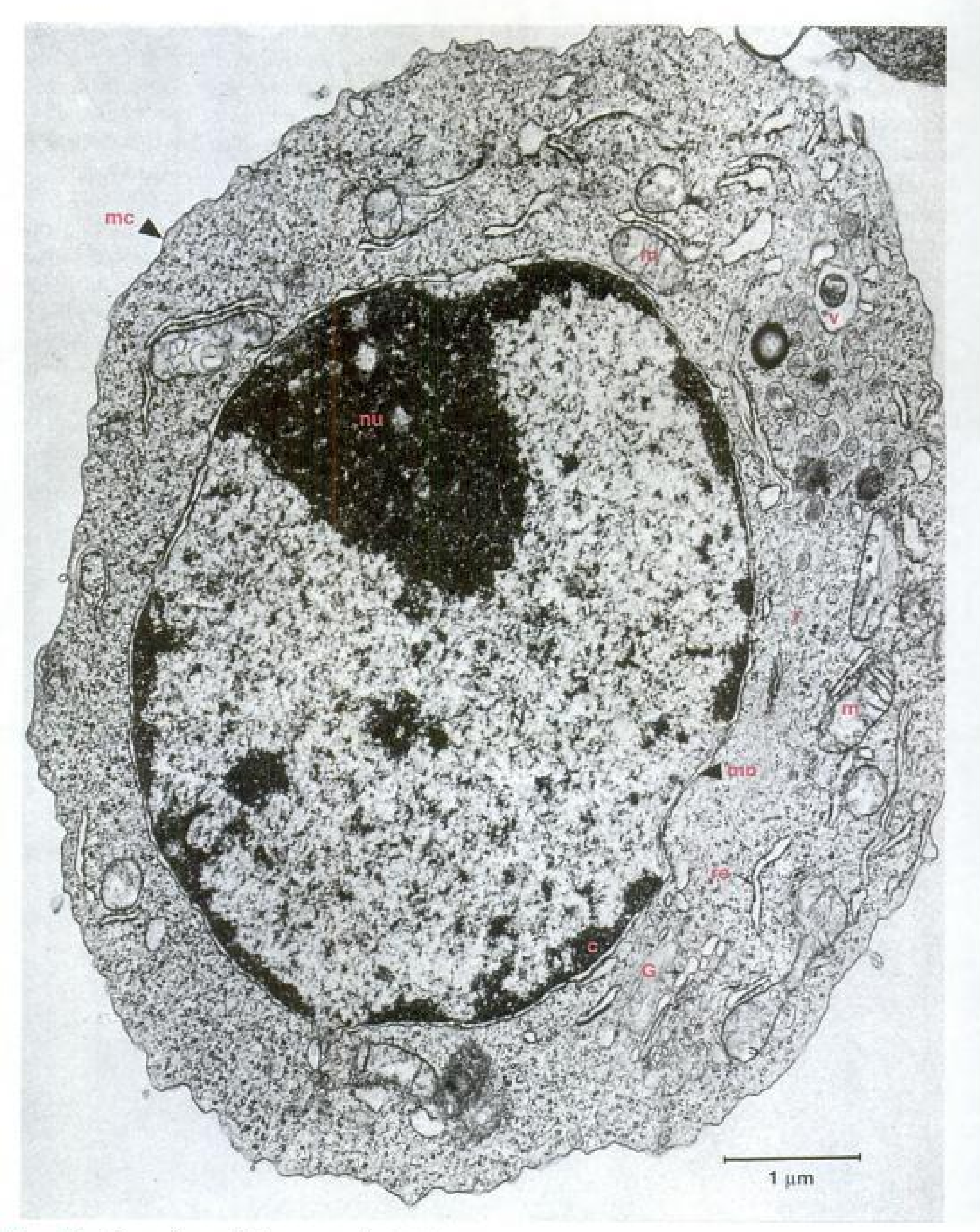


Figure I.1 – Coupe d'une cellule eucaryote (× 20 000)
(Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de microscopie électronique, Pr. Vivier).
mc : membrane cytoplasmique ; m : mitochondries ; v : vacuole ; l : lysosome ; mn : membrane nucléaire ; nu : nucléole ; r : ribosomes ; N : noyau ; m : mitochondrie ; c : chromatine ; re : réticulum endoplasmique ; G : appareil de Golgi.

Copyrighted material

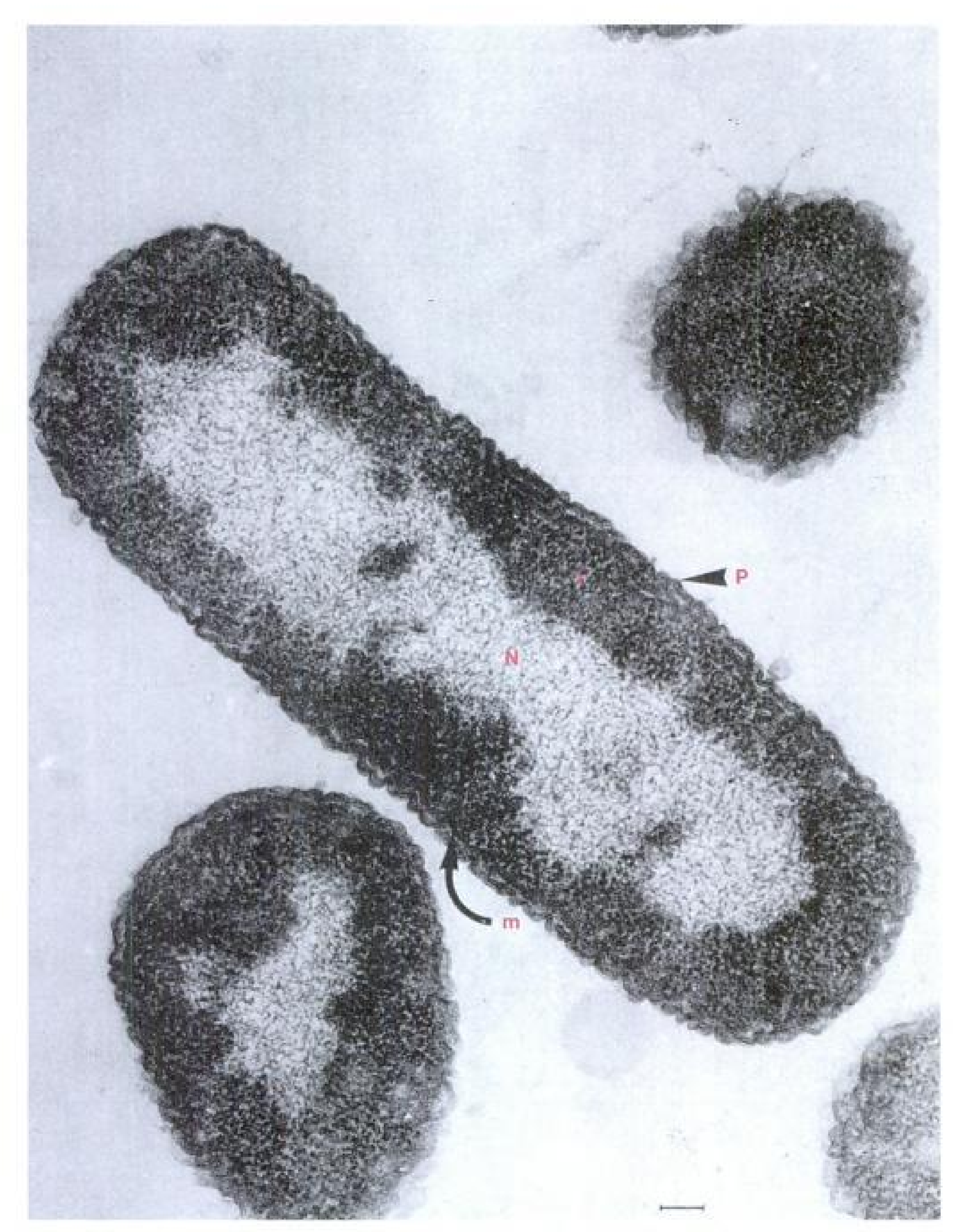


Figure I.2 – Coupe d'une cellule procaryote : une bactérie, *Bacillus subtilis* (× 70 000)
(Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de microscopie électronique, Pr. Vivier).
p : paroi ; m : membrane cytoplasmique ; r : ribosome ; N : noyau.

Copyrighted material

Tableau I.2 – **Comparaison des cinq règnes.**

Place dans la classification	Protistes inférieurs (monères)	Protistes	Mysètes	Plantes (métaphytes)	Animaux (métazoaires)
Type cellulaire	Procaryotes	Eucaryotes	Eucaryotes	Eucaryotes	Eucaryotes
Nutrition	Variée : absorption, photo-synthèse, chimio-synthèse mais pas d'ingestion	Absorption, ingestion ou photosynthèse	Absorption	Photosynthèse, absorption	Ingestion
Besoins en oxygène	Soit toxique, soit toléré, soit nécessaire	Nécessaire	Nécessaire	Nécessaire	Nécessaire
Reproduction et développement	Reproduction asexuée. Des recombinaisons génétiques ont parfois lieu. Pas de mitose ni de méiose	Reproduction asexuée. En outre, dans certains cas, méiose et fécondation	Cellules haphoïdes ou dicaryotiques. Propagation par spores haploïdes. Fécondation par conjugaison, méiose	Fécondation de la femelle par le gamète mâle. Phase diploïde se développant à partir d'un embryon	Les spermatozoïdes et l'ovule forment un zygote qui conduit à une blastula
Type de vie	Unicellulaire isolé, filamenteux, colonial ou mycélial. Non mobile ou mobile par glissement ou par flagelle	Unicellulaires aquatiques. Quelques formes coloniales multicellulaires et mycéliales	Forme mycéliale, accessoirement unicellulaires	Multicellulaire, sédentaire, le plus souvent vivant sur le sol	Multicellulaire, typiquement mobile grâce à des muscles
Structures et fonctions caractéristiques	Parois contenant des peptidoglycanes. Pas de mouvements intra-cellulaires. Flagelles composés de flagelline. Certains produisent des endospores ou des structures de fructification	Pas d'embryon ni de connexions intercellulaires complexes. Diverses parois cellulaires et pellicules protéiques. Quelques-uns n'ont pas de parois. Phagocytose. Mouvements intra-cellulaires.	Parois cellulaires continues. Pas de phagocytose. Filaments (hyphes) divisés en segments par des parois cellulaires perforées. Mouvements intracellulaires importants	Différenciation tissulaire importante. Paroi cellulaire cellulosique. Produisent des composés complexes secondaires (exemple : terpènes et anthocyanines)	Différenciation cellulaire et tissulaire importante. Pas de paroi cellulaire. Phagocytose. Connexions complexes entre les cellules (exemple : desmosomes)
Exemples	Bactéries, cyanobactéries, actinomycètes	Amibes, ciliés, radiolaires, diatomées, algues unicellulaires ou pluricellulaires	Levures, moisissures, champignons	Mousses, hépatiques, plantes à fleurs	Éponges, vers, coraux, mollusques, insectes, mammifères

Copyrighted material

Tableau I.3 – Principaux caractères des cellules eucaryotes et procaryotes.

Structure	Eucaryote	Procaryote
APPAREIL NUCLÉAIRE		
Structure	Au repos une membrane nucléaire règle les échanges avec le cytoplasme	Pas de membrane nucléaire, le noyau est diffus dans le cytoplasme
Composition	**ADN** associé à des histones	**ADN**, pas d'histones
Génophores	Nucléaires, mitochondriales, chloroplastiques	Nucléaires, plasmidiques
Organisation	Plusieurs chromosomes, visibles au moment de la division	Chromosome circulaire enchevêtré (aspect fibrillaire)
Chromosomes	Forme et nombre **variables** caractéristiques de l'espèce	En général **unique**
Reproduction		
Type	Division binaire de la cellule	Division binaire de la cellule
Division nucléaire	**Mitose** (appareil mitotique)	amitotique
Reproduction sexuée	Par fusion de 2 cellules reproductrices	**Rare** et très variée
Fusion nucléaire	Formation d'un **zygote** diploïde à l'origine d'échanges génétiques	Conjugaison sans fusion cellulaire, transfert partiel de matériel génétique d'une cellule donatrice à une réceptrice
Division nucléaire réductrice	Possible **méiose**	Absente
CYTOPLASME		
Structure	Complexe par le **réticulum endoplasmique**	Pas de réticulum endoplasmique
Mouvement	Continuellement en état de cyclose	Pas de courants cytoplasmiques
Ribosomes	Très nombreux, libres (80 S) ou sur les systèmes membranaires internes	Très nombreux, libres (70 S)
Autres organites	Présents (mitochondries, golgi, lysosomes, etc.)	Absents
Respiration	Par des organites spécialisés : **mitochondries**	Enzymes localisées au niveau de la membrane cytoplasmique
Photosynthèse présence chez :	Algues	Cyanobactéries (ex. algues bleu-vert) et quelques bactéries photosynthétiques
Organites spécialisés	**Chloroplastes**	Pas de chloroplastes, présence de chromatophores ou de systèmes membranaires
PAROI		
Présence	Inconstante	Constante, quelquefois réduite
Rôle principal	Protection	Protection
Constitution	Réseau macromoléculaire. Pas de mucopeptide Algues vertes : cellulose Champignons : chitine	Réseau macromoléculaire **muréine.** Pas de muréine chez les Archéobactéries (composition variable)

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

- Présenter les différents groupes d'organismes eucaryotes et procaryotes. Dégager leurs caractères distinctifs.
- Indiquer les caractères distinctifs entre cellules eucaryotes et cellules procaryotes.



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes

1. C'est....................(1632-1723) qui conçut le..................le plus simple.

2. Vers 1860, ...met au point un procédé de conservation universellement connu sous le nom de..................

3. Vers 1900,......... a mis au point la technique............chirurgicale.

4. La prévention de la..........est la dernière grande œuvre de Pasteur.

5. Metchnikoff établit les bases de......................en découvrant la..................

6. Watson et Crick découvrent le modèle de.................. en 1953 et la.....................en 1962.

7. La période actuelle est marquée par l'essor du...................... et des...........................

8. On donne indistinctement le nom de......... ou de........... aux organismes unicellulaires ou multicellulaires qui sont dénués de.................................

9. La............., est la science qui a pour objet l'étude des protistes.

10. La cellule.............comprend un « vrai » noyau entouré d'une.........., contenant deux jeux semblables de............ Elle est..................

11. La cellule............. ne possède pas un « vrai » noyau mais un..................diffus, non isolé du cytoplasme par une.........., avec, en général, un seul.................. Elle est dite...............

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier

1. Tous les microbes sont des bactéries.

2. On trouve des algues parmi les microbes.

3. La mycologie est l'étude des bactéries des contrées froides.

4. L'utilisation industrielle des microbes remonte au XIXe siècle et résulte des travaux de Pasteur.

5. Les archéobactéries sont des bactéries découvertes dans les fouilles archéologiques.

6. Pasteur met au point le vaccin contre la rage sans aucune connaissance sur les virus.

7. Les ribosomes des bactéries et des levures n'ont pas la même structure.

8. Les procaryotes peuvent se nourrir par phagocytose.

9. Les bactéries se divisent par mitose.

10. La mise en œuvre des postulats de Koch impose l'expérimentation animale.

CORRIGÉS

1. Compléter par :

1. Van Leeuwenhoek ; microscope.

2. Pasteur ; pasteurisation.

3. Lister ; d'asepsie.

4. Rage.

5. L'immunité cellulaire ; phagocytose ?

6. Structure de l'ADN ; structure en double hélice.

7. Génie génétique ; biotechnologies.

8. Protistes ; microbes ; différenciation cellulaire.

9. Microbiologie.

10. Eucaryote ; enveloppe nucléaire ; chromosomes ; diploïde.

11. Procaryote ; appareil nucléaire ; membrane ; chromosome ; haploïde.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : on y trouve aussi des algues, des champignons et des parasites.

2. 6. 7. 10. Vrai.

3. Faux : c'est l'étude des champignons.

4. Faux : dès l'Antiquité, les microbes ont été utilisés à grande échelle (vinification, vinaigre, fromage, etc.) mais sans vraiment connaître la nature des phénomènes en jeu.

5. Faux : ce sont des bactéries dont la structure semble très ancienne (archaïque) et que l'on trouve par exemple dans les sources chaudes, dans les milieux très salés ou très acides.

8. Faux : il n'y a jamais de phagocytose (chez les bactéries, par exemple, la paroi rigide externe rend impossible ce processus).

9. Faux : il n'y a pas de mitose chez ces organismes ; chez les bactéries, la division de l'ADN (qui n'est pas une mitose), dure souvent environ 10 minutes.

Copyrighted material

Chapitre 2

Morphologie et structure des micro-organismes

Les perfectionnements considérables apparus dans les techniques d'investigation biologique sont à la base des connaissances de l'ultrastructure cellulaire. Se limitant dans un premier temps à l'observation des cellules, ces techniques ont évolué au cours du XXe siècle vers la séparation puis l'analyse des différents éléments constitutifs. Il n'est pas question, ici, de les analyser dans le détail. Il suffira d'en préciser le rôle dans la connaissance de l'ultrastructure.

1. Techniques d'étude

1.1. Observation de la cellule

La mise au point du premier microscope par Antony Van Leeuwenhoek *(fig. II.1)* au cours du XVIIIe siècle marque le point de départ de la microbiologie. L'appareil utilisé, constamment amélioré depuis *(fig. II.2)*, permet avec des grandissements pouvant aller jusqu'à 2 500 (1 000 étant l'utilisation courante) d'observer des structures dont la taille est de l'ordre de 1 µm. Divers procédés peuvent être utilisés :

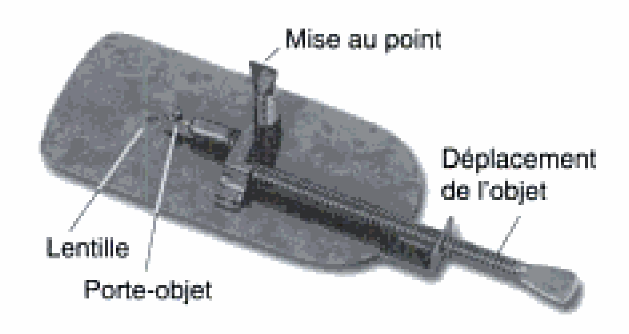


Figure II.1 – Microscope.
A. Van Leeuwenhoek.

– observation entre lame et lamelle, dite à l'**état frais**, de micro-organismes en milieu liquide. Sa variante, la coloration à l'encre de Chine, assure la mise en évidence de la capsule. Le lutage de la préparation empêche sa dessiccation trop rapide ;

– observation de frottis séchés, fixés et colorés. Les **colorations** de Gram et de Ziehl-Nielsen permettent la reconnaissance des bactéries pathogènes ; d'autres font apparaître spécifiquement les cils, les spores, les corpuscules métachromatiques. Les frottis sont examinés à « l'**immersion** » en plaçant une goutte d'huile spéciale entre la lentille de l'objectif et la préparation afin d'obtenir une image plus nette.

D'autres procédés nécessitant un système optique particulier ou additionnel sont quelquefois nécessaires. L'examen sur **fond noir** (condenseur spécial) est indispensable pour observer les tréponèmes (syphilis). L'observation en **contraste de phase** révèle les détails morphologiques des micro-organismes vivants non colorés.

Copyrighted material

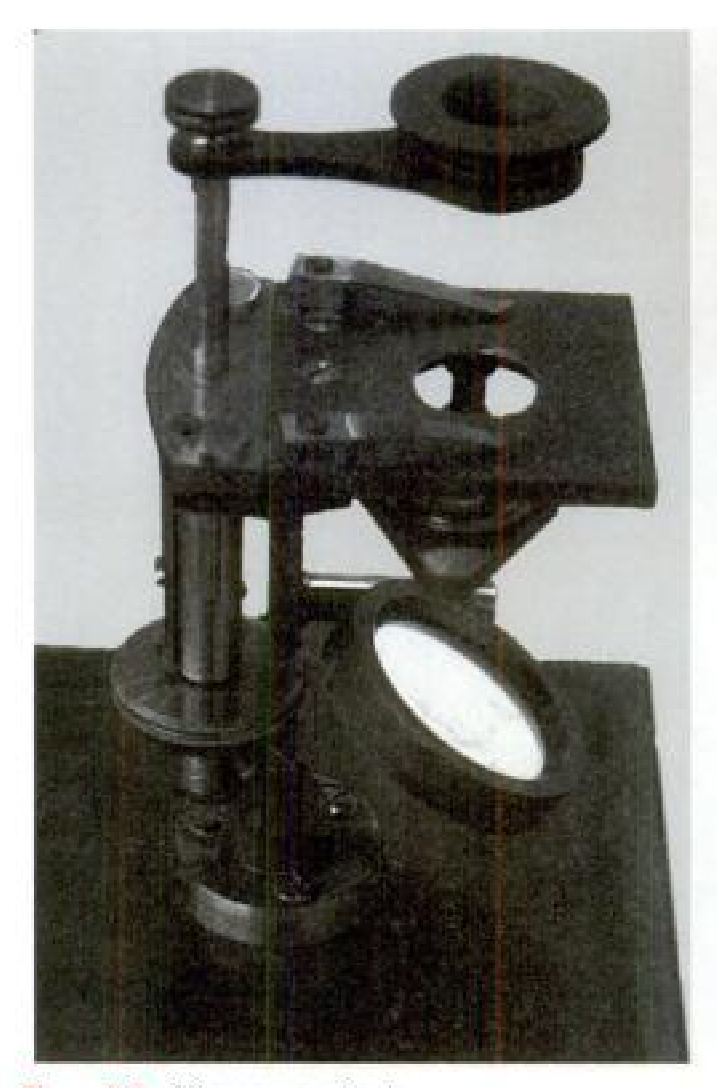


Figure II.2 – **Microscope simple.**
Premier microscope produit en petite série par Carl Zeiss à Jena en 1847.



Figure II.3 – Microscope électronique à balayage.
(Document Philips).

Tout cela concerne la **microscopie** dite **photonique**, où l'on utilise le rayonnement lumineux. Le pouvoir de résolution reste cependant limité et, pour révéler des éléments d'une taille de 5 à 10 nm, on fait appel à la **microscopie électronique** *(fig. II.3)* en utilisant la propriété des différentes structures de retenir ou de laisser passer un faisceau d'électrons. Cette technique exige une préparation préalable du matériel cellulaire.

Les méthodes de **fixation** du matériel biologique (par exemple tétraoxyde d'osmium), d'inclusion (par exemple résine époxy) puis d'observation de coupes ultrafines en microscopie électronique – après traitement par des sels de métaux lourds comme les sels d'uranium ou de plomb (**coloration positive**), par l'acide phosphotungstique (coloration négative) ou par vaporisation d'un métal tel que l'uranium, l'or ou le platine qui bombarde sous un angle donné la préparation à étudier (**ombrage**) – donnent accès à la structure fine de la cellule.

Le procédé plus récent de **cryodécapage**, qui n'exige pas les étapes de fixation et d'inclusion, évite en même temps toutes les altérations et artefacts inhérents aux méthodes précédentes. Après congélation rapide, l'échantillon cellulaire est « cassé » dans une enceinte réfrigérée. Le film de platine et de carbone qui recouvre la surface mise à nu réalise l'ombrage de la préparation. Après élimination de l'échantillon biologique par dissolution dans un mélange d'eau de Javel et d'acide sulfurique, on obtient un moulage des surfaces intracellulaires produites au cours de la fracture des cellules.

La **microscopie électronique à balayage** (M.E.B.) permet d'obtenir des images « en relief » de la cellule bactérienne. Enfin, l'amélioration constante des techniques photographiques et leur adaptation au microscope permettent la conservation des images.

1.2. Séparation des constituants cellulaires

L'étude plus précise des constituants cellulaires nécessite leur séparation. Pour les libérer, il faut rompre les enveloppes protectrices de la cellule (paroi et membrane). On a recours à différents procédés :

– les ultrasons ;

– les enzymes, comme le **lysozyme**, qui détruisent la paroi bactérienne ;

Copyrighted material

– la pression osmotique, où des bactéries traitées par le lysozyme et placées en milieu hypotonique gonflent et éclatent ;

– la pression mécanique, où le broyage par des billes de verre assure la rupture de la paroi et de la membrane ;

– le froid, par le procédé de **cryolyse**, c'est-à-dire par congélations et décongélations successives.

Les méthodes de fractionnement par **ultracentrifugation** ou par **centrifugation en gradient de densité** (le plus souvent en gradient de saccharose) permettent de séparer les différents organites cellulaires.

1.3. Analyse fine ultrastructurale

Pour rechercher, en microscopie électronique, un ou plusieurs constituants chimiques au niveau cellulaire, on peut avoir recours à l'analyse cytochimique ultrastructurale.

L'**autoradiographie** permet ainsi de localiser les sites de synthèse de composants macromoléculaires chez lesquels s'incorpore un précurseur marqué. Après contact plus ou moins prolongé entre les cellules et le précurseur radioactif puis élimination de l'excès du métabolite marqué, les cellules sont fixées puis incluses selon les règles. Les coupes sont ensuite placées sur un support (lame de verre ou grille de microscopie électronique) puis recouvertes d'une émulsion photographique. Au cours du temps de contact, les sels d'argent (Ag^+) sont réduits en argent métallique par les radiations émises par l'isotope radioactif. Les préparations sont ensuite « développées » comme s'il s'agissait d'un film puis colorées pour mettre en évidence l'organisation cellulaire. L'observation microscopique révèle, d'une part, les structures cellulaires et, d'autre part, des amas de grains noirs (argent réduit) alignés ou regroupés, correspondant aux sites de synthèse des macromolécules.

Les **méthodes immunocytochimiques** poursuivent le même objectif de localiser dans la cellule un composant macromoléculaire appartenant ou étranger à la cellule (antigène bactérien, virus, etc.). Hautement spécifiques, elles reposent sur les affinités particulières existant entre antigènes et anticorps homologues. Pour localiser une substance antigénique *x* dans une cellule, on la met en contact avec des anticorps marqués. La formation de **complexes antigènes-anticorps** stables permet de repérer la présence du constituant *x*. En microscopie optique, les anticorps sont couplés à un chromophore fluorescent, habituellement l'isothiocyanate de fluorescéine. En microscopie électronique, le marqueur couplé à l'anticorps doit être opaque aux électrons. À cette fin, l'anticorps peut être associé à la **ferritine**, une protéine riche en fer. Dans un autre procédé, l'anticorps est lié à une enzyme, la **peroxydase**. Après contact anticorps-cellules, les coupes sont incubées en présence d'un peroxyde, l'eau oxygénée, et d'un donneur d'hydrogène, la diaminobenzidine (DAB). Le traitement des coupes au tétraoxyde d'osmium, qui se fixe préférentiellement sur le complexe antigène-anticorps-DAB, détermine un précipité opaque aux électrons au niveau du complexe.

L'étude de chaque constituant pris isolément peut être entreprise. Elle fera appel aux procédés classiques du fractionnement chimique :

– hydrolyse acide (chlorhydrique, trichloracétique) ;

– mise en solution par solvants organiques (alcool, alcool-éther).

On arrive à obtenir séparément les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Cette étude sera complétée par des traitements enzymatiques (endopeptidases et exopeptidases, glucosidases, endonucléases et exonucléases, lipases, etc.), des analyses **chromatographiques** ou **électrophorétiques**, des **séquençages** protéiniques ou nucléotidiques.

On pourra obtenir ainsi la composition chimique globale de la cellule bactérienne telle qu'elle est donnée dans le *tableau II.1*.

2. Cellule bactérienne

Les bactéries sont les plus petits organismes connus doués de métabolisme et capables de croître et de se diviser aux dépens de substances nutritives. Leur diamètre est habituellement d'environ

Copyrighted material

Tableau II.1 – **Constitution chimique des bactéries.**
(D'après C. Senez, Microbiologie générale, Doin, Paris).

1 - Teneur en eau (% du poids):

Escherichia coli	73-78
Pseudomonas aeruginosa	75
Bacillus anthracis	80
Mycobacterium tuberculosis	86

2 - Composition élémentaire d'Escherichia coli

Elément	% du poids sec
Carbone	50 ± 5
Azote : par Kjeldahl par analyse isotopique (Roberts et coll.)	 10,3 15
phosphore	3,2
soufre	1,1
Cendres (total) sels fixes (non extractibles par l'eau) sels libres (extractibles)	12,75 7,25 5,5
Macromolécules	
protéines	50
acides nucléiques : ADN	3-4
ARN	10
polysaccharides	4-9
lipides	10-15
Pool de métabolites	
amino-acides, nucléotides libres, sucres, acides organiques, esters, oligopeptides (glutathion), ATP, vitamines, coenzymes	

1 µm. Durant de longues années, on a considéré la bactérie comme un « sac d'enzymes » car le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de sa structure. C'est la microscopie électronique avec ses différents modes d'exploitation qui a mis en lumière l'architecture de la bactérie telle qu'elle est représentée sur la *figure II.4*. Les coupes ultrafines ont permis en particulier de découvrir sa structure détaillée. La cellule apparaît entourée d'une enveloppe rigide, la **paroi**, qui lui donne sa forme, sa résistance et qui entoure une seconde enveloppe beaucoup plus mince et plus délicate, la **membrane cytoplasmique**. Le **cytoplasme** sous-jacent, en général très homogène, contient essentiellement des granulations d'acide ribonucléique, les ribosomes, parfois aussi des substances de réserve qui rendent sa structure plus grossière. Il **ne renferme aucun des organites** décrits dans la cellule eucaryote (réticulum endoplasmique, mitochondries, etc.).

Dans le cytoplasme, l'**appareil nucléaire** se distingue par son aspect fibrillaire, finement réticulé. Il n'est pas entouré d'une membrane. La paroi, la membrane, le cytoplasme et l'appareil nucléaire représentent les structures essentielles de la cellule, qui sont toujours présentes. D'autres structures peuvent éventuellement s'y adjoindre : la **capsule**, enveloppe externe, qui peut prendre un développement considérable lorsqu'on favorise la synthèse de ses constituants ; les **flagelles**, de nature protéique, qui confèrent à la bactérie sa mobilité ; enfin les ***pili*** ou ***fimbriae***, plus fins que les flagelles, rigides et cassants ; certains, appelés *pili* sexuels, joueraient un rôle au cours de la conjugaison bactérienne ; les **spores**, enfin, qui sont des formes de résistance n'existant que chez certaines espèces bactériennes.

2.1. Morphologie cellulaire

Lorsqu'on observe des bactéries au microscope optique à partir de prélèvements pathologiques ou d'un milieu de culture, on reconnaît rapidement la forme des cellules, leurs dimensions et, enfin, les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles. Toutes ces informations définissent la morphologie bactérienne qui a constitué durant de longues années le critère essentiel de reconnaissance et d'identification.

2.1.1. Taille

Le schéma de la *figure II.5* montre que les bactéries se situent entre les virus et les algues unicellulaires ou les protozoaires. Dans les zones limites, il existe des chevauchements, c'est-à-dire que les plus grandes des bactéries, comme certains spirilles, atteignent la taille d'une algue et que les plus petites ont des dimensions analogues ou même inférieures à celles de certains gros virus.

Copyrighted material

capsule
plasmide
paroi
pigment
pili
membrane cytoplasmique (double feuillet)
cytoplasme
vacuole à gaz
ADN (appareil nucléaire)
chromatophore
polysome
cil
ribosomes
espace périplasmique (réduit chez les Gram+)
grains de réserve
flagelle

Figure II.4 – Schéma de la cellule bactérienne.

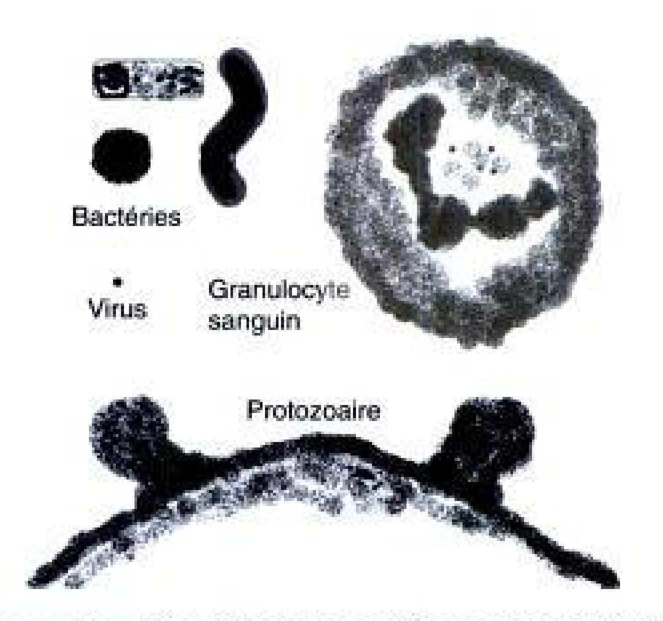


Figure II.5 – Dimensions des bactéries par rapport aux virus, aux cellules sanguines, aux protozoaires.

Les quelques exemples suivants permettent de bien situer les différences de taille :

– les mycoplasmes comme *My. pneumoniae.*, de l'ordre de 0,1 µm ;

– les entérobactéries comme *E. coli*, 1 × 2 à 3 µm ;

– les tréponèmes (par exemple *Treponema pallidum*), de 0,1 à 0,2 × 5 à 20 µm ;

– les spirochètes, de 0,2 à 0,7 × 5 à 500 µm.

2.1.2. Forme

Les formes des bactéries sont extrêmement diverses. Nous en retiendrons trois principales : la forme sphérique ou coccoïde, la forme cylindrique ou en bâtonnet et la forme spiralée ou hélicoïdale.

Copyrighted material

2.1.2.1. Forme sphérique

Elle caractérise les cocci (pluriel de coccus) *(fig. II.6)*. Le mode de division de ces derniers donne naissance à des groupements typiques, utiles à observer du point de vue diagnostique. Chez les diplocoques, chaque cellule se divise dans un seul plan et donne naissance à deux nouvelles cellules étroitement associées : elles ont un aspect effilé en « flamme de bougie » avec les **pneumocoques**, elles sont réniformes ou en « grain de café » avec les **gonocoques** ou les **méningocoques**. Lorsque ce mode de division se poursuit régulièrement, la bactérie engendre des chaînettes plus ou moins longues, caractéristiques des **streptocoques**.

Les cocci qui se divisent successivement sur deux plans forment des groupements de quatre cellules, les **tétrades**. D'autres, en se multipliant dans les trois directions de l'espace, composent des cubes réguliers de cellules, que l'on rencontre chez les **sarcines**, ou des amas asymétriques dits en grappes comme chez les **staphylocoques**.

Ces différents types de groupements sont représentatifs de l'espèce. Cette concordance n'est pas systématiquement observée mais elle peut être mise utilement à profit en tenant compte surtout de l'aspect prédominant.

2.1.2.2. Forme cylindrique

Les formes cylindriques ou en bâtonnet *(fig. II.7)* sont aussi diverses que celles des cocci. On en distingue deux principales : le bâtonnet droit ou **bacille** et le bâtonnet incurvé ou **vibrion**. La première caractérise de nombreuses bactéries : les entérobactéries aux extrémités arrondies, les *Bacillus* beaucoup plus gros et nettement rectangulaires, les bacilles fusiformes aux extrémités effilées, en fuseau, les **corynébactéries** renflées à l'un de leurs pôles, « en massue ». Ces dernières offrent en outre des modes de groupements très particuliers « en palissade » ou « en paquet d'épingles ».

Comme les cocci, les bacilles peuvent être associés deux par deux en **diplobacilles** ou former de véritables chaînettes. Dans certains cas, le corps bactérien lui-même peut être déformé par une endospore centrale, subterminale ou terminale. Parfois, ces bacilles peuvent être de très petite taille et se confondre avec des cocci : on leur donne alors le nom de **coccobacilles**.

La deuxième forme cylindrique est celle du **vibrion**, bacille incurvé « en virgule ». Les vibrions ne constituent qu'un seul genre réunissant de nombreuses espèces aquatiques et quelques espèces pathogènes pour l'homme *(V. cholerae)*.

2.1.2.3. Forme spiralée

On la rencontre chez un petit groupe de micro-organismes *(fig. II.8)* possédant une structure typique, un corps hélicoïdal et extrêmement allongé. On les distingue entre eux par leur longueur, le nombre et l'amplitude de leurs ondulations. Les **leptospires**, de 5 à 10 µm de long, ont des extrémités en crochet ; la taille des **tréponèmes** peut atteindre 15 µm ; celle des *Spirocheta*, de beaucoup supérieure, se situe entre 30 et 500 µm.

2.1.2.4. Autres formes

En dehors de ces aspects bien connus, nous mentionnerons la forme **pédonculée** propre aux *Caulobacter*, la forme **filamenteuse** des bactéries ferrugineuses ou *Sphaerotilus*, enfin les formes **mycéliennes**, à peine ramifiées chez les mycobactéries et nettement ramifiées chez les **Actinomycètes** *(fig. II.9)*.

2.2. Paroi

Enveloppe caractéristique de la cellule procaryote, la paroi rigide est un véritable « exosquelette » qui confère à la cellule sa forme et lui permet de résister à la forte pression osmotique interne comprise entre 5 et 20 atmosphères.

La paroi est notamment formée d'un polymère, le **peptidoglycane** (encore appelé **mucopeptide** ou **muréine** ou **mucocomplexe**). La distinction entre bactéries à **Gram positif** et à **Gram négatif** repose sur une différence de composition chimique **pariétale**.

La paroi joue un rôle essentiel dans la division cellulaire tout en servant de vecteur primaire à sa propre biosynthèse. Certaines de ses couches sont le site de nombreux **déterminants antigéniques** majeurs. L'un de ceux-ci, le **lipopolysaccharide**,

Copyrighted material

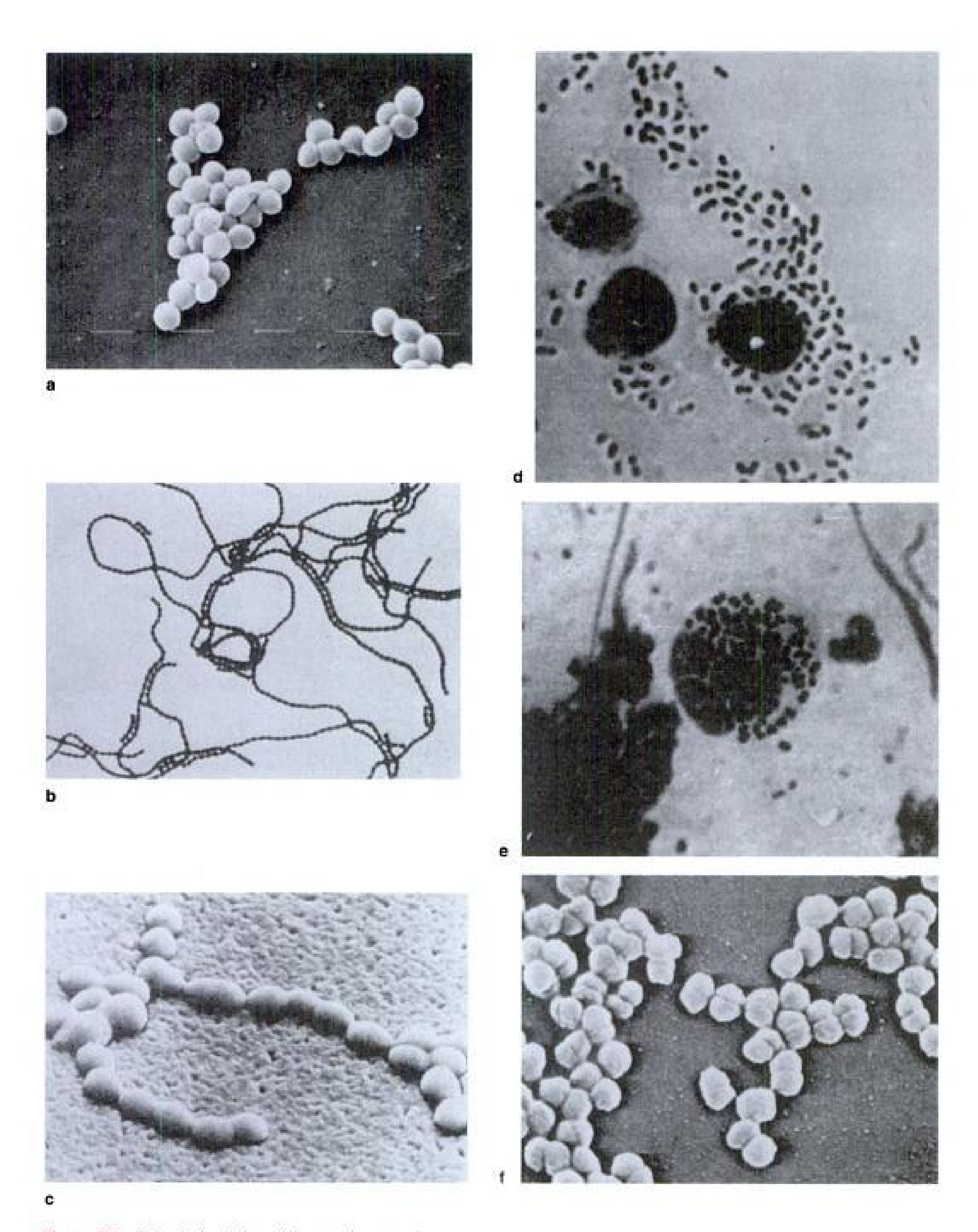


Figure II.6 – Morphologie bactérienne : les cocci.

a : *Staphylococcus aureus* ; b : *Strepstococcus agalaxiae* ; c : *Streptococcus faecalis* ; d : *Diplococcus pneumonieae* ; e : *Neisseria meningitidis* ; f : *Neisseria gonorrhoeae* (*photos a et f reproduites avec l'aimable autorisation du Pr. Monteil*, Strasbourg).

Copyrighted material

a

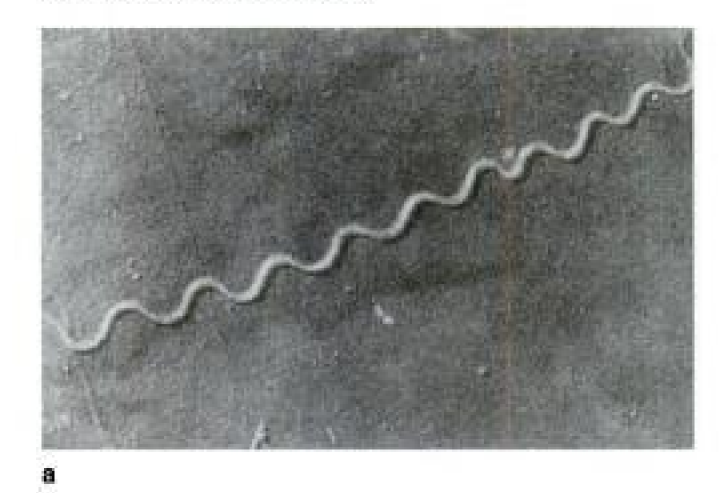
b

c

d

Figure II.7 – **Morphologie bactérienne : les bacilles.**

a : *Listeria monocytogenes* ; b : *Bacillus subtilis* : c : *Proteus vulgaris* ; d : *Vibrio cholerae*. (*photos reproduites avec l'aimable autorisation du Pr. Monteil*, Strabourg).



a

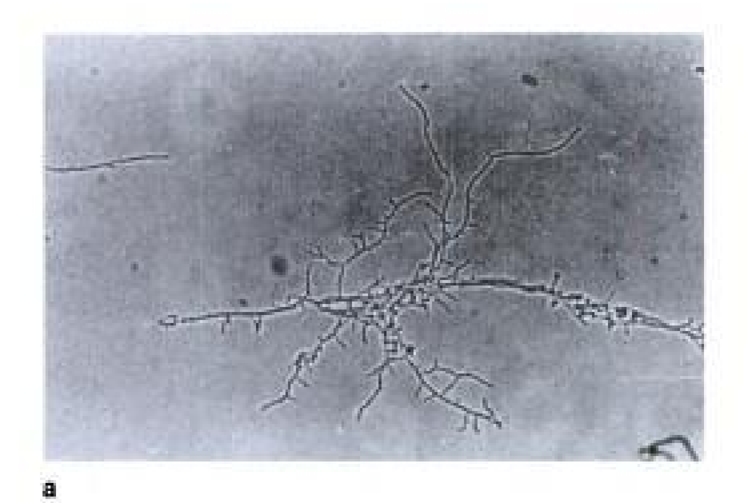


b

Figure II.8 – **Morphologie bactérienne : les spirochètes.**

a : *Treponema pallidum* ; b : *Leptospira zuelzerae.*

Copyrighted material



a



b

Figure II.9 – Morphologie bactérienne : autres formes.
a : *Streptomyces* ; b : *Micromonospora*.

propre aux bactéries à Gram négatif, n'est autre qu'une endotoxine douée de propriétés pharmacologiques puissantes. La paroi ne constitue pas une barrière sélective comme la membrane : elle est perméable chez les bactéries à Gram négatif. L'un des feuillets, la **membrane externe**, s'oppose pourtant à la pénétration des plus grosses molécules.

2.2.1. Mise en évidence

L'étude des constituants de la paroi nécessite au préalable son isolement des autres éléments cellulaires. Les anciennes méthodes d'extraction chimique ont fait place à de nouveaux procédés fondés sur la désintégration des bactéries par broyage à l'aide d'abrasifs ou sous l'effet des ultrasons, ou par congélations et décongélations successives, ou encore sous l'action d'enzymes. Les parois brutes ainsi obtenues sont purifiées par **centrifugation différentielle** puis lavage à l'eau distillée pour éliminer les composants cytoplasmiques. Examinées au microscope électronique, elles ressemblent à des sacs aplatis, froissés et présentant une déchirure par laquelle les constituants cytoplasmiques se sont échappés. Leur surface est lisse et leur contour dessine parfaitement la morphologie de la cellule *(fig. II.10 et II.11)*. L'étude chimique précise de la paroi peut être entreprise, après vérification de sa pureté, par observation microscopique.

2.2.2. Composition chimique

La paroi représente 20 % du poids sec de la cellule bactérienne. On y rencontre des éléments diversement représentés selon les espèces. La coloration de Gram révèle très grossièrement ces différences. Le *tableau II.2* établit cette comparaison entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

2.2.2.1. Osamines

Après isolement, purification puis hydrolyse des constituants de la paroi, plusieurs osamines ont été isolés :

– la N-acétylglucosamine ;

– l'acide N-acétylmuramique, qui représente l'éther lactique en position 3 de la N-acétylglucosamine ;

– la galactosamine, qui est présente chez certaines espèces seulement et en faible proportion.

L'acide muramique, grâce à une fonction semialdéhydique réductrice et un groupe carboxyle libre, peut établir des liaisons entre les peptides et les polyosides ; il joue ainsi un rôle prépondérant dans la structure pariétale.

Les formules de ces composés sont reproduites sur la *figure II.12*.

2.2.2.2. Acides aminés

Trois acides aminés peuvent être qualifiés de majeurs parce qu'ils sont isolés régulièrement chez la plupart des bactéries. Ce sont : la D-ala-

Copyrighted material

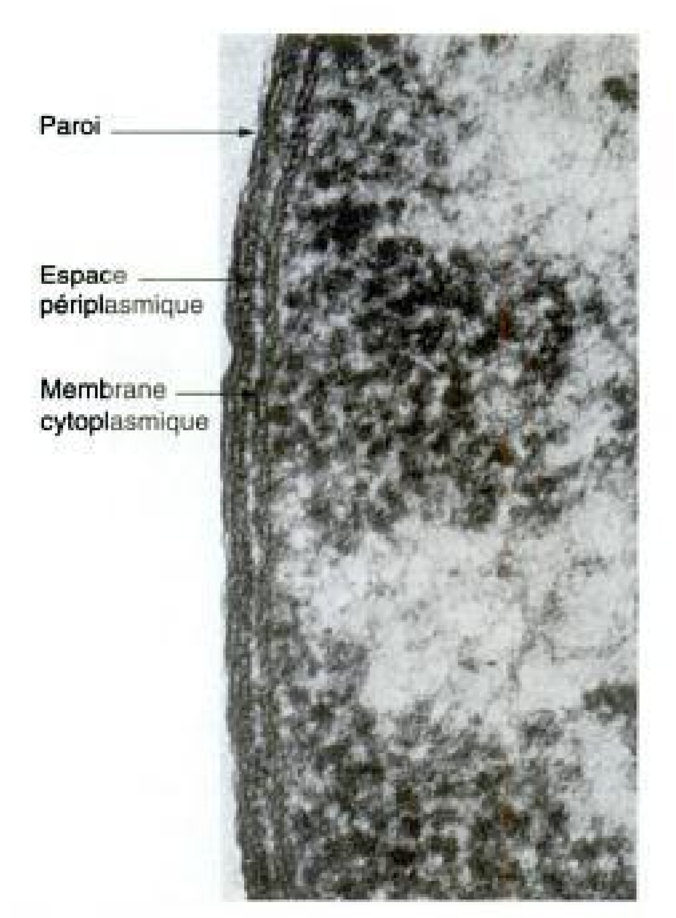


Figure II.10 – Paroi bactérienne d'*Escherichia coli* vue en microscopie électronique.



Figure II.11 – *E. coli* en M.E.T. après cryofracture. Cette technique permet de visualiser l'aspect des surfaces cellulaires comme la membrane cytoplasmique ou la paroi *(avec l'aimable autorisation de M. Kniebieller et JP. Chauvin IBDM Luminy Marseille).*

nine et la L-alanine, l'acide glutamique, la lysine ou l'acide diamino-pimélique (forme L ou méso) selon les cas. La profonde analogie entre ces deux derniers corps explique sans aucun doute leur alternance dans les espèces bactériennes. On rencontre en outre d'autres acides aminés, la glycine chez *St. aureus,* l'acide aspartique chez

Tableau II.2 – Composition chimique globale de la paroi chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.
(D'après C. Senez, Microbiologie générale, Doin, Paris).

	Bactéries Gram +	Bactéries Gram –
Osamines	+++	+
Acides aminés	24-35 %	50 % env.
nombre	4 à 10	16-17
acide diaminopimélique	+++ exclut la lysine	+ n'exclut pas la lysine
Acides teichoïques	+++	–
Oses	20-60 %	20-60 %
Lipides	1-2,5 %	10-22 %

Figure II.12 – Les osamines de la paroi bactérienne.
a : *N-acétylglucosamine* ; b : *Acide N-acétylmuramique.*

L. acidophilus, etc. Il faut remarquer l'absence de nombreux acides aminés que l'on rencontre habituellement dans les protéines.

2.2.2.3. *Acides teichoïques*

Présents uniquement chez les bactéries à Gram positif et pouvant représenter jusqu'à 50 % du poids de la paroi (soit environ 5 % du poids sec de la bactérie), ils sont localisés soit dans la paroi, soit dans le feuillet externe de la membrane cytoplas-

Copyrighted material

mique et ils pourraient avoir un rôle antigénique. Deux types d'acides teichoïques ont été isolés. Ce sont :

– le polyribitol-phosphate, polymère linéaire, rencontré en particulier chez *St. aureus* (*fig. II.13b*) ; il est localisé dans la paroi ;

– le polyglycérol-phosphate plus ou moins glycosylé, isolé en particulier chez *B. subtilis* (*fig. II.13a*), *Str. faecalis*...

a b

Figure II.13 – **Acides teichoïques.**
a : à glycérol ; b : à ribitol.

Localisés au niveau de la membrane, ils sont généralement liés à un glycolipide du type polyglycosyl-diglycéride et sont alors appelés « acides lipoteichoïques », notamment chez *Str. lactis*.

Des acides dits teichuroniques, formés d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine, ont été isolés chez *B. licheneformis*.

2.2.2.4. Oses simples

Ils sont nombreux à être mis en évidence : glucose, galactose, mannose, fucose, etc. Certains d'entre eux sont spécifiques (rhamnose chez les *Streptococcus* du groupe A). Leur nature et leurs types d'associations dans les chaînes polyosidiques confèrent aux antigènes de paroi leur spécificité.

2.2.2.5. Lipides

Ils sont présents en faible quantité et, parfois même, presque totalement absents chez les bactéries à Gram positif. Ce sont essentiellement des lipides simples entrant dans la composition des lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif.

2.2.2.6. Acides mycoliques

Ces molécules ne sont présentes que chez certaines espèces particulières, les bactéries acido-alcoolo-résistantes telles les mycobactéries. Ce sont des acides gras à très longue chaîne (C = 60) ramifiée et présentant des méthylénations. Sur la *figure II.14* est reproduite la formule de l'acide α-mycolique.

Chez les corynébactéries, des acides à plus courte chaîne (C = 32 à 36) ont également été isolés. On leur donne le nom d'acides corynémycoliques.

2.2.3. Structure moléculaire

En microscopie électronique, on observe une nette différence de structure entre les parois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. La paroi des Gram positif est en général plus épaisse (de 15 à 80 nm) et d'aspect plus homogène, alors que celle des Gram négatif est plus fine (de 6 à 15 nm) et plus hétérogène (*fig. II.10, II.17 et II.18*). L'élément structural de base pour toutes les bactéries est le peptidoglycane.

Figure II.14 – **L'acide α-mycolique.**

Copyrighted material

2.2.3.1. Peptidoglycane

Il s'agit d'un glycosaminopeptide comportant une molécule de **N-acétylglucosamine** et une molécule d'**acide N-acétylmuramique** reliées entre elles par une liaison glycosidique. L'acide acétylmuramique est en outre associé à une courte chaîne peptidique de quatre acides aminés appelée **tétrapeptide** : deux alanines, un acide glutamique et une lysine. La structure de ce mucopeptide, qui représente l'élément de base de la paroi, peut être schématisée de la façon suivante :

– les unités mucopeptidiques sont polymérisées grâce à deux principaux types de liaisons ;

– l'acide acétylmuramique en est, en quelque sorte, le ciment. Grâce à ses groupements carboxyle libres, il est relié aux chaînes peptidiques ; grâce à ses fonctions semi-aldéhydiques, il réunit les molécules d'acétylglucosamine *(fig. II.15)*. Cette structure de polymère en réseau, qui donne à la cellule sa rigidité, est caractérisée par :

- les liaisons glycosidiques β1-4 entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine,

- l'ordre invariable des acides aminés qui se succèdent dans le chaînon tétrapeptidique,

- l'existence des formes D et L,

- la liaison β-glycosidique, qui unirait l'acide teichoïque au résidu N-acétylglucosamine,

- le pontage entre la D-alanine d'un tétrapeptide et la L-lysine d'un autre tétrapeptide voisin, grâce à un pentapeptide de glycine.

Ainsi se forme le peptidoglycane, polymère d'un poids moléculaire élevé, structure de base de toutes les parois et qui représente jusqu'à 90 % du matériel de cette paroi.

Il peut différer, selon les cas, par des constituants secondaires, en particulier par les acides aminés du chaînon peptidique et par la nature des ponts interpeptidiques *(fig. II.16)* :

– *St. aureus* : L-ala-D-glu-L-lysD-ala ; deux peptides voisins reliés par un pont pentaglycine ;

– *E. coli* : L-ala-D-glu-DAP-D-ala ; deux peptides voisins reliés directement entre la D-alanine de l'un et le DAP de l'autre ;

– *Micrococcus lysodeikticus* : L-ala-D-glu-L-lys-D-ala L-gly ; deux peptides voisins reliés par un peptide de même composition.

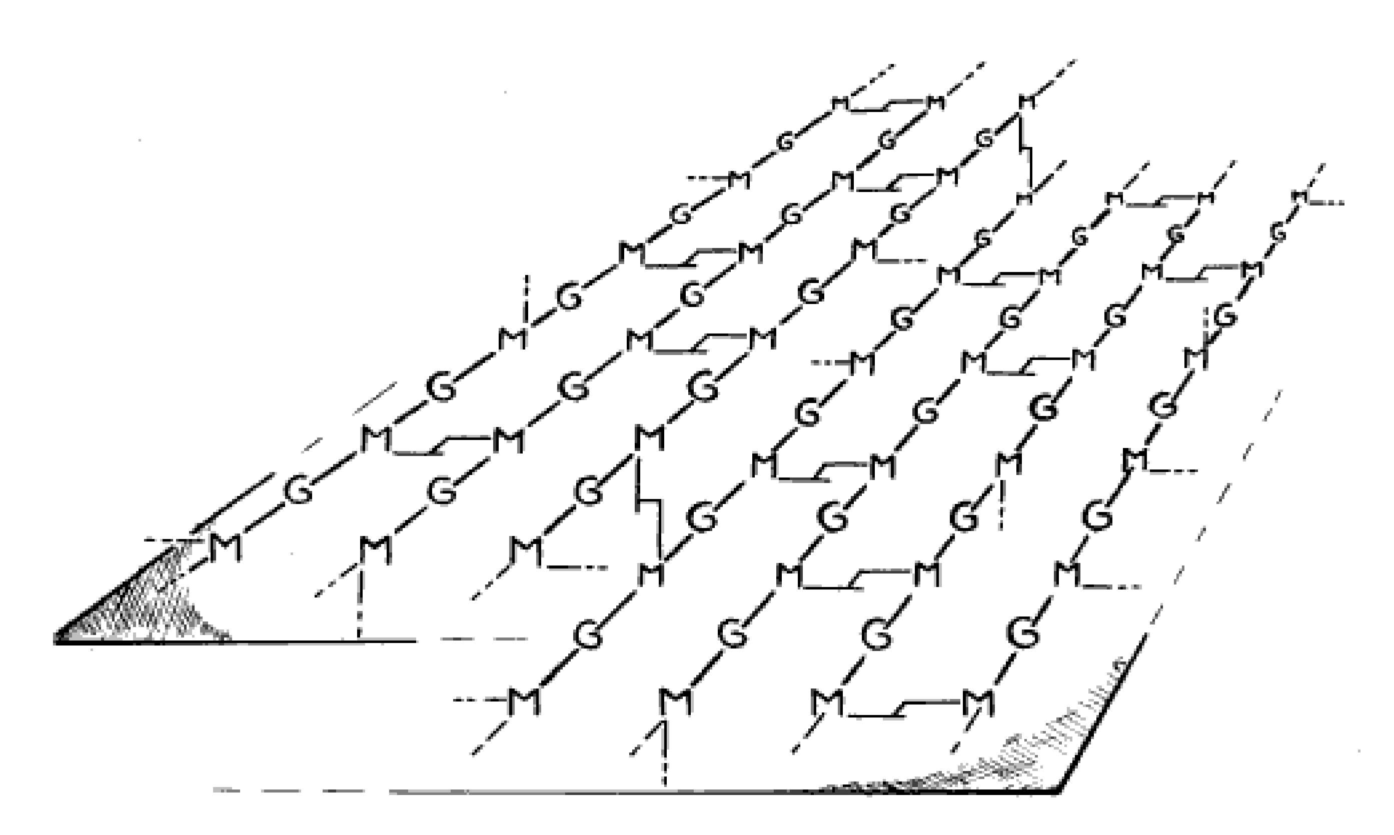


Figure II.15 – **Structure du peptidoglycane représentée en deux plans superposés.**
G N-acétylglucosamine   M Acide N-acétylmuramique   ___/‾‾‾ Pontage peptidique.

Copyrighted material

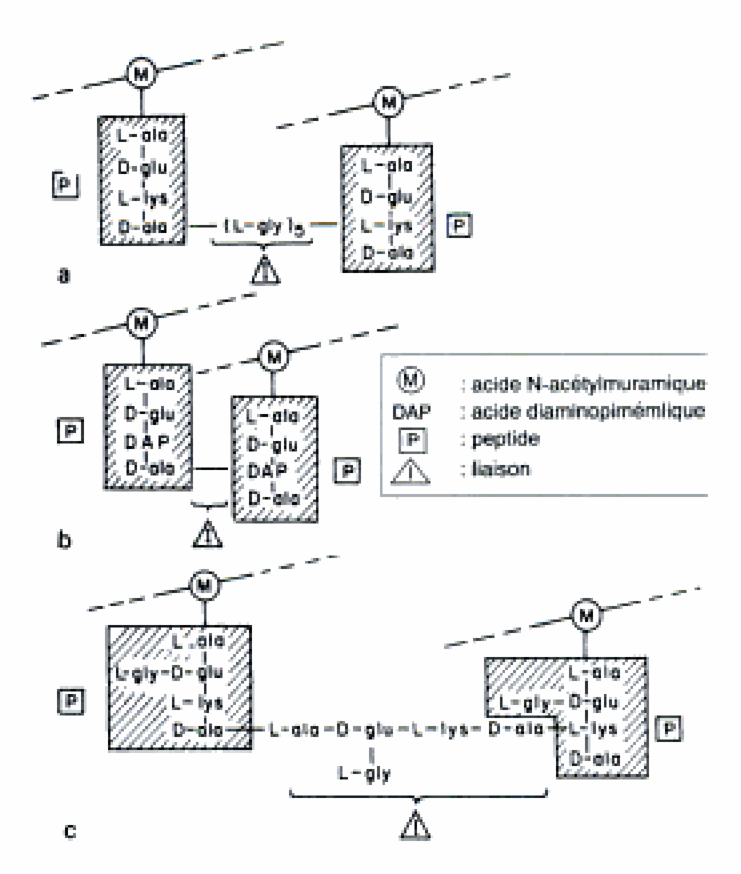


Figure II.16 – **Peptides et liaisons interpeptidiques dans le peptidoglycane.**

Ces différences déterminent un réseau plus ou moins serré : lâche pour les formes sphériques (liaison interpeptidique longue), plus compact pour les formes bacillaires (liaison interpeptidique directe).

2.2.3.2. Bactéries à Gram positif

Les acides teichoïques représentent le deuxième composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram positif ; ils constituent jusqu'à 50 % du poids sec de la paroi. Ce sont des polymères composés d'unités glycérolphosphates liées en 1,3 ou 1,2 ou d'unités ribitolphosphates liées en 1,5 ou encore d'unités plus complexes dans lesquelles le glycérol ou le ribitol sont associés à des sucres comme le glucose, le galactose ou la N-acétylglucosamine. Ils contiennent souvent de grandes quantités de D-alanine attachées au glycérol en position 2 ou 3, ou au ribitol en position 3 ou 4.

La localisation exacte des acides teichoïques au niveau des enveloppes est mal connue. Au cours du fractionnement cellulaire, la plupart restent soudés au matériel de paroi par l'intermédiaire d'une unité de liaison, un trimère de glycérolphosphate. Pourtant, un petit pourcentage, sous forme d'acide glycérolteichoïque, demeure relié à la membrane cytoplasmique. Les **acides lipoteichoïques de membrane** sont unis, par liaison covalente, aux glycolipides membranaires *(fig. II.17)*.

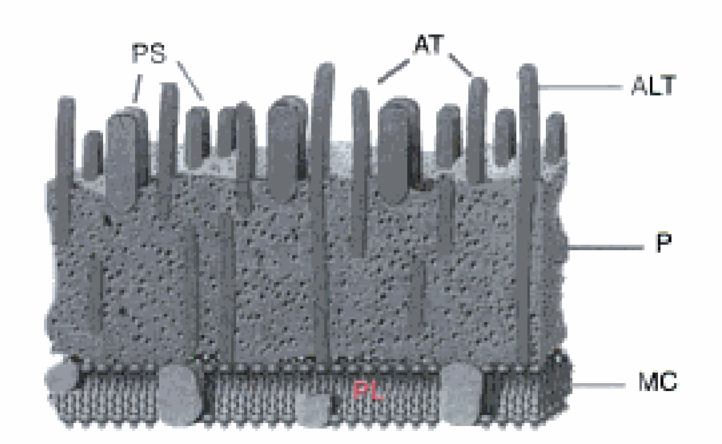


Figure II.17 – **Schéma des enveloppes cellulaires des bactéries à Gram positif.**

MC : membrane cytoplasmique ; P : peptidoglycane ; PL : phospholipides ; AT : acides teichoïques ; ALT : acides lipoteichoïques ; PS : protéines de surface (*S. Layer* : couche de surface présente chez certaines espèces comme *Bacillus* et *Clostridium*, peut également se trouver chez des Gram négatif).

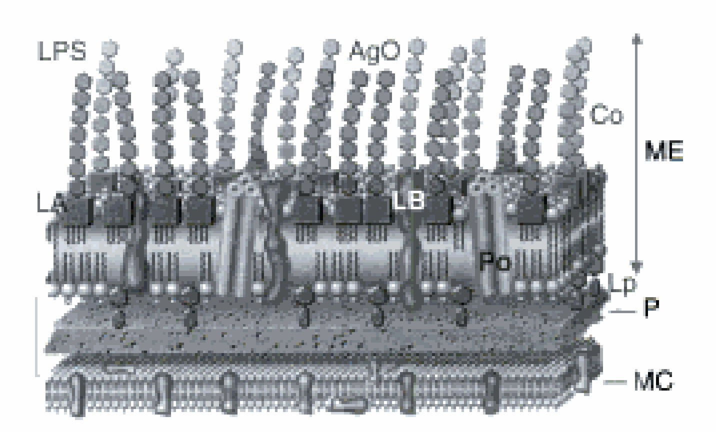


Figure II.18 – **Schéma des enveloppes cellulaires des bactéries à Gram négatif.**

MC : membrane cytoplasmique ; P : peptidoglycane ; ME : membrane externe ; LPS : lipopolysaccharides avec LA (lipide A) Co (core) AgO (polysaccharides de l'antigène O) ; LB : lipoprotéines de Braun ; Po : porines ; Lp : lipoprotéines.

Copyrighted material

2.2.3.3. Bactéries à Gram négatif

La paroi présente une structure stratifiée plus complexe. Outre le peptidoglycane de base, elle comprend trois autres structures polymériques externes ou reliées à ce peptidoglycane. On distingue en effet :

– une couche phospholipidique dite **membrane externe** pour la différencier de la membrane cytoplasmique et qui contient des protéines importantes ;

– **un lipopolysaccharide (LPS)** ;

– enfin, une **lipoprotéine** assurant la liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane et conférant une certaine solidité à l'ensemble.

2.2.3.3.1. Membrane externe

Elle possède les caractéristiques fondamentales d'une membrane biologique. Elle est constituée d'une double couche de phospholipides amphipathiques dans laquelle une assez large fraction de ces molécules phospholipidiques est remplacée par des molécules lipopolysaccharidiques (LPS).

Comme la membrane cytoplasmique, c'est une mosaïque fluide contenant un lot de protéines spécifiques enchâssées dans la matrice phospholipidique. Parmi celles-ci, on distingue des **protéines majeures** représentant 70 % des protéines membranaires, groupées pour former des pores au niveau de cette membrane externe. On leur donne le nom **porine**. Elles permettent la diffusion de petites molécules. Nombre de ces protéines sont désignées sous le terme Omp (pour *outer membran protein*). Plus de 40 ont été isolées de 30 espèces bactériennes différentes.

La porine OmpC forme des pores de 1,1 nm, l'OmpF de 1,2 nm chez *E. coli*. Elles traversent de part en part la membrane externe et sont fortement liées au peptidoglycane. On distingue aussi des protéines dites mineures (au moins 12) impliquées dans le transport spécifique de petites molécules par ailleurs trop volumineuses pour passer à travers les pores, comme la vitamine B12, certains complexes ferriques, des nucléosides ou des oligosaccharides (maltose). Ainsi la protéine Lamb est spécifique de la pénétration du maltose et des maltodextrines. Plusieurs de ces protéines servent de récepteurs à des phages (Tel Lamb est le site de fixation des bactériophages λet K10) ou à des colicines spécifiques. Enfin, on trouve des lipoprotéines dont les unes sont reliées au peptidoglycane tandis que les autres se trouvent à l'état libre dans la membrane externe.

2.2.3.3.2. Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (*fig. 18*) des bactéries à Gram négatif est également connu sous le nom d'endotoxine parce qu'il est fortement lié à la surface cellulaire et n'est libéré qu'après lyse cellulaire. Après extraction à partir des cellules intactes puis hydrolyse ménagée (par exemple, en mélange phénol-eau à 90 °C), on obtient le lipide A, support de la toxicité de la molécule entière, et un polysaccharide responsable de la spécificité antigénique du complexe.

Le **lipide A** est, en fait, un glycophospholipide. C'est un polymère composé d'unités disaccharidiques de glucosamine reliées entre elles par des ponts pyrophosphates et auxquelles sont rattachées de longues chaînes d'acides gras. On peut noter la présence constante de l'acide β-hydroxymyristique, un acide gras en C14, spécifiquement rencontré et caractéristique de ce lipide.

Le **polysaccharide** du LPS est formé d'une partie centrale, le **core** qui est commun à toutes les bactéries à Gram négatif mais dont la composition peut varier sensiblement selon les espèces (par exemple, *Salmonella, Shigella*), et de chaînes latérales faites de séquences répétitives distinctes en fonction des espèces ou des sérotypes (par exemple, *Salmonella*). Le core (*fig. 18*) du lipopolysaccharide de *Salmonella* comprend 5 hexoses (dont la N-acétylglucosamine) suivis de 2 heptoses puis de 3 résidus d'un sucre en C8, le cétodésoxyoctonate (KDO). Dans un LPS donné, chaque chaîne latérale polysaccharidique contient les mêmes séquences répétitives constituées de sous-unités de **trisaccharides**, **tétrasaccharides** ou **pentasaccharides**. Chez les entérobactéries, particulièrement bien étudiées, la chaîne latérale appelée **polysaccharide O**, pour la distinguer du polysaccharide du core, comprend 4 hexoses (galactose, glucose, rhamnose, mannose) ainsi que 1 ou plusieurs sucres inhabituels : les didésoxyhexoses (abéquose, colitose, paratose, tyvélose). Ces chaînes sont plus ou moins longues même au sein du même micro-organisme, pouvant contenir jusqu'à 40 unités répétitives.

2.2.3.3.3. Lipoprotéine de Braun

C'est une petite molécule polypeptidique de 58 acides aminés portant à son extrémité N termi-

Copyrighted material

nale des constituants lipidiques (M : 72 kd) et qui compte un très grand nombre de copies dans les cellules d'*E. coli* (7 105). Elle existe sous forme libre (2/3 des molécules) ou sous forme liée au peptidoglycane (1/3 des molécules).

La partie lipidique est enchâssée dans la membrane externe par des liaisons hydrophobes avec les phospholipides ; la partie protéinique est associée au peptidoglycane par liaisons covalentes (par exemple, *E. coli*) entre les groupements NH_2 des lysines et les groupements COOH des acides diaminopiméliques des chaînons latéraux tétrapeptidiques.

2.2.3.3.4. *Espace périplasmique*

Les bactéries à Gram positif synthétisent diverses exoenzymes capables de fragmenter les éléments nutritifs et de les rendre accessibles au métabolisme (par exemple, protéase) ou de dénaturer des antibiotiques (par exemple, pénicillinase) ou encore de produire un effet nocif (par exemple, exotoxine). Au contraire, la plupart des protéines élaborées par les bactéries à Gram négatif sont retenues dans l'espace périplasmique compris entre les deux membranes interne et externe. Elles peuvent être libérées par transformation des cellules en sphéroplastes ou par choc osmotique, ce qui rend compte de leur localisation.

2.2.3.3.5. *Autres types de parois*

Chez les entérobactéries, les trois feuillets pariétaux, bien que visibles et différenciés à l'examen au microscope électronique, sont intimement soudés l'un à l'autre. Cela n'est pas le cas pour tous les bacilles à Gram négatif. Ainsi chez les *Moraxella*, les *Vitreoscilla* et chez *Spirillum serpens*, la couche mucopeptidique est assez distincte de l'enveloppe externe, laquelle présente une certaine souplesse due à ses ondulations. Avec les spirochètes, ce phénomène est encore plus accentué : l'enveloppe externe, spiralée, apparaît nettement séparée de la muréine. Dans cet espace interpariétal sont localisées les nombreuses fibrilles du filament axial.

Chez les *Methanobacteriales* (archéobactéries), le peptidoglycane (si on peut l'appeler ainsi) présente une structure très différente. C'est un polymère constitué de N-acétyl-D-glucosamine ou de N-acétyl-D-galactosamine alternant avec des résidus de N-acétyl-D-talosaminuronique liés en 1,3. Les sous-unités peptidiques associées comprennent l'alanine, l'acide glutamique et la lysine.

Chez les mycobactéries (par exemple, *M. tuberculosis*) la paroi est caractérisée par une grande richesse en lipide en particulier en acides gras comme les **acides mycoliques** *(figure II.14)*.

2.2.4. Fonctions

Pour bien comprendre le rôle de la paroi, on peut procéder aux expériences suivantes qui tendent à la supprimer. On utilise l'action d'une enzyme spécifique, le lysozyme, qui rompt les liaisons β1-4 des chaînes polyosidiques du peptidoglycane.

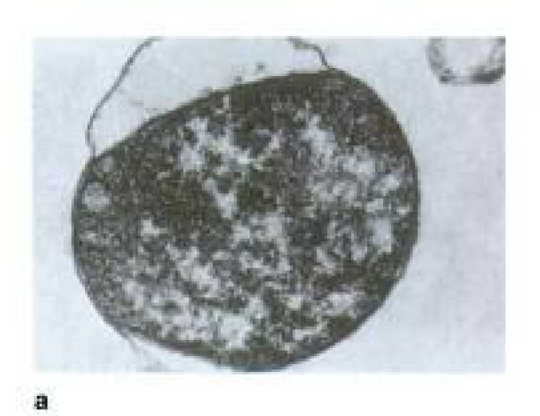
- **Première expérience** : elle est réalisée sur un bacille à Gram positif, *B. subtilis* *(fig. II.19A)*. La paroi est détruite, la cellule gonfle et éclate. Pour éviter la lyse, on équilibre la pression interne par une forte concentration de saccharose. Dans ces conditions, la paroi est détruite mais la cellule n'éclate pas ; elle prend une forme sphérique que l'on appelle **protoplaste**. Par rapport à la bactérie initiale, elle a perdu ses propriétés antigéniques, ne fixe plus les bactériophages et ne se divise plus.

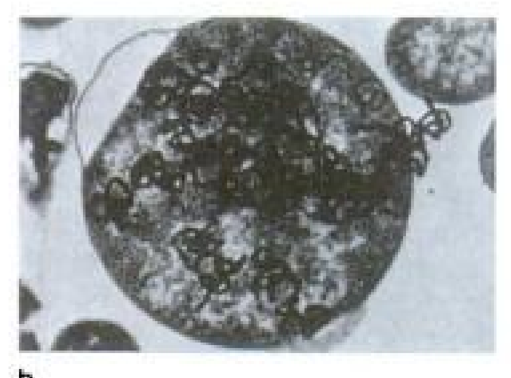


Figure II.19A – **Naissance d'un protoplaste de *B. subtilis*.**

La paroi s'est rompue à une extrémité et le protoplaste se dégage (× 50 000) *(photo reproduite avec l'aimable autorisation de Mme Ryter, Institut Pasteur)*.

Copyrighted material


a


b


c

Figure II.19B – Sphéroplastes d'*Escherichia coli*.
(Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de microscopie électronique, Pr. Vivier.
a : × 18 000 ; b : marquage autoradiographique, × 18 000 ; c : en formation, × 9 000.

• **Deuxième expérience** : on réalise la même expérience que ci-dessus sur une bactérie à Gram négatif *(E. coli)* *(fig. 19B)*. En milieu hypersaccharosé, la paroi est détruite mais la cellule n'éclate pas ; elle prend une forme globuleuse, que l'on appelle **sphéroplaste**, qui a conservé toutes les propriétés de la bactérie initiale.

Cette différence est logique puisque l'enzyme agit au niveau du peptidoglycane et que la paroi des bactéries à Gram négatif possède, en plus, d'autres couches qui restent intactes. On peut conclure de ces expériences que :

– la paroi joue un rôle dans la forme de la cellule ;

– elle joue également un rôle dans la résistance à la pression interne de la cellule car il faut travailler en milieu hypertonique pour éviter la lyse de la cellule sans paroi ;

– le peptidoglycane ne joue certainement aucun rôle dans les propriétés antigéniques, la division cellulaire ou la fixation des bactériophages.

2.2.4.1. Propriétés antigéniques

Bien avant l'isolement et la caractérisation chimique de la paroi, il était admis que les principaux constituants antigéniques bactériens, de même que les récepteurs bactériophagiques, se trouvaient au niveau des structures cellulaires de surface. La nature de ces substances a été largement étudiée mais leur topographie et leur localisation anatomique n'a pu être véritablement établie qu'après l'isolement des structures de la paroi et de la membrane. Les différences chimiques que l'on a constatées entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif se retrouvent, amplifiées, au niveau de la structure antigénique. Les deux exemples suivants sont propres à illustrer ces différences.

2.2.4.1.1. Bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, le mucocomplexe représente sans doute le constituant essentiel de la paroi. Cependant, l'existence d'autres polymères, d'autres structures étroitement associées au mucocomplexe devient rapidement évidente. Ces constituants « supplémentaires » sont plus importants du point de vue antigénique que le mucocomplexe. Chez les *Staphylococcus*, ce sont les acides teichoïques ou leurs sous-unités polyholosidiques qui sont les principaux antigènes. Chez les *Streptococcus*, deux catégories d'antigènes ont été isolées. Les uns de nature polyosidique sont appelés **antigènes C** en raison de leur nature hydrocarbonée ; ils sont à la base de la classification antigénique de Lancefield qui définit un grand nombre de **groupes sérologiques**, A, B, C, D, E, etc. À chaque groupe correspond un antigène C distinct, c'est-à-dire un ou des polyholosides différents. Dans le groupe A qui rassemble la plupart des *Streptococci* pathogènes pour l'homme, l'antigène C contient essentiellement un rhamnose et de la N-acétylglucosamine. Le groupe G est caractérisé par le rhamnose et la N-acétylgalactosamine.

Les autres, de nature protéinique, sont appelés antigènes M, T et R. La **protéine M** est la plus importante sur les plans immunologique et physiopathologique. Elle permet en effet de différencier, à l'intérieur du groupe A, 56 types sérologiques différents. Elle est aussi le support de la virulence des souches. La représentation topographique de ces antigènes est reproduite sur la *figure II.20*.

Copyrighted material

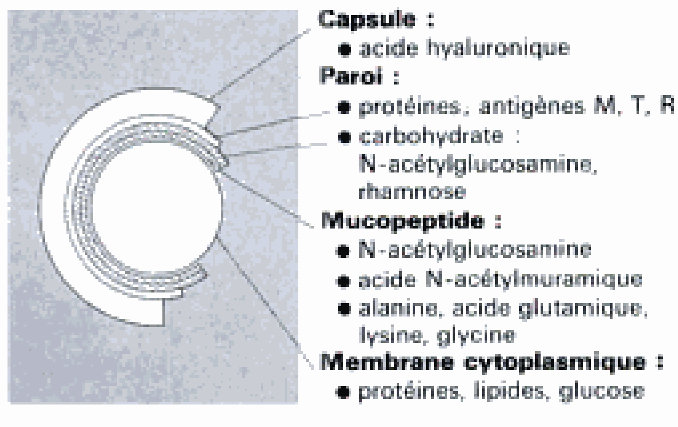


Figure II.20 – **Constituants antigéniques de paroi chez les Streptococci du groupe A.**
(R. M. Krausf : Streptococci and Streptococcal Diseases ; Academic Press, 1972).

2.2.4.1.2. Bactéries à Gram négatif

La plupart des *Enterobacteriaceae*, les *Salmonella* en particulier, possèdent les deux antigènes principaux, **somatique O** et **flagellaire H**. Ces dénominations proviennent d'observations faites à propos des *Proteus* : les souches flagellées, mobiles, envahissent la surface des géloses en formant un film, en allemand *Hauch*, d'où le nom d'antigène H. Les souches non flagellées, immobiles, se cultivent en colonies isolées sans former de film, *Ohne Hauch* (sans film) en allemand, d'où l'appellation antigène O. Celui-ci, le seul qui retiendra notre attention, est un gros complexe où sont étroitement associés glucides, lipides et protéines. C'est l'antigène glucido-lipido-polypeptidique *(fig. II.18)* isolé pour la première fois par Boivin et Mesrobeanu à l'aide d'acide trichloracétique. Il est pariétal et correspond aux deux couches lipopolyholosidique et lipoprotéinique.

La classification des *Salmonella* par Kauffmann et White en groupes sérologiques puis en sérotypes repose sur la diversité des facteurs O et H, les premiers étant désignés par des chiffres allant de 1 à 65. La spécificité antigénique dépend de la nature de ces lipopolyholosides ou de leurs constituants sucrés et de leur mode de liaison. Les principaux sucres isolés peuvent être rassemblés en trois groupes : les hexoses comprenant le glucose, le galactose, le mannose ; les 6-désoxyhexoses comme le fucose, le rhamnose ; des sucres particuliers, les 3-6-didésoxyhexoses tels le tyvélose ou 3-6-didésoxy-D-mannose, le colitose ou 3-6-didésoxy-L-galactose, l'abéquose ou 3-6-didésoxy-D-galactose, etc. Ainsi, l'antigène 09 est rencontré chez *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*. Toutes les souches qui ont en commun le facteur antigénique 09 font partie du groupe D des *Salmonella* L'antigène 04 est présent chez *S. paratyphi* B, *S. typhi murium*… Il caractérise le groupe B. Cette constitution polyholosidique permet la classification des différentes espèces sérologiques en 16 groupes chimiques appelés chémotypes. Le *tableau II.3* en donne quelques exemples.

Tableau II.3 – **Sucres constitutifs des antigènes O chez les *Salmonella*.**
(Extrait de Kauffmann, Luderitz, Stierlin et Westphal, 1960).

Espèces	Groupe sérologique	Antigène	Galactosamine	Glucosamine	Heptose (s)	Galactose	Glucose	Mannose	Fucose	Rhamnose	Abéquose	Colitose	Paratose	Tyvélose
S. paratyphi A	A	1, 2, 12		+	+	+	+	+		+			+	
S. paratyphi B	B	4, 12		+	+	+	+	+		+	+			
S. paratyphi C	C_1	6, 7		+	+	+	+	+						
S. typhi	D_1	9, 12		+	+	+	+	+		+				+
S. anatum	E	3, 10		+	+	+	+	+		+				
S. mississippi	G	1, 13, 23	+	+	+	+	+		+					
S. minnesota	L	21	+	+	+	+	+							
S. adelaïde	O	35		+	+	+	+							
S. inverness	P	38	+	+	+	+	+					+		
S. milwaukee	U	43	+	+	+	+	+		+					

Copyrighted material

Ces propriétés sont à la base d'applications pratiques importantes. En effet, elles permettent d'identifier une espèce bactérienne par ses caractères non seulement morphologiques, culturaux ou biochimiques mais aussi antigéniques. Cette carte d'identité antigénique est appelée **sérotype**. D'autre part, lors d'une infection, on peut être amené à rechercher les anticorps apparus par agglutination directe avec des préparations antigéniques spécifiques connues (voir § 5.3.). Avec *E. coli*, on retrouve cette même diversité antigénique (jusqu'à 157 antigènes O différents). Leur recherche, associée à celle des antigènes de surface, est utile dans le diagnostic des **gastro-entérites infantiles**.

2.2.4.2. Fixation des bactériophages

Les espèces bactériennes sont capables de fixer des virus appelés **bactériophages**. Cette propriété est également liée à la paroi où se trouvent des sites de fixation. Chez les bactéries à Gram positif, ces sites sont localisés au niveau des acides teichoïques. Cette fixation représente le premier stade de l'infection par un bactériophage. Elle peut être suivie de la lyse bactérienne (infection lytique). Cette propriété est utilisée pour identifier certaines espèces, cette carte d'identité étant appelée **lysotype** (voir § 5.4).

2.2.4.3. Coloration de Gram

La paroi bactérienne peut être plus ou moins perméable au passage de certains solvants. Cette propriété est mise à profit au cours de la **coloration de Gram**.

En 1884, Gram, un médecin danois, mit au point la méthode de coloration qui porte son nom. Elle consiste à traiter un frottis ou un étalement bactérien séché, fixé à la chaleur, par une solution de violet de cristal puis par une solution iodo-iodurée (Lugol). En soumettant la préparation à l'action de l'éthanol, les cellules bactériennes réagissent de deux façons et forment deux groupes : les unes, dites à Gram négatif, se décolorent rapidement sous l'action du solvant ; les autres, au contraire, conservent leur coloration violette et sont dites à Gram positif. Pour accentuer le contraste, la préparation est finalement traitée par de la fuchsine ou de la safranine : les bactéries à Gram négatif se colorent en rose, tandis que celles à Gram positif restent colorées en violet.

La constance et la valeur de la réaction de Gram laissent entendre qu'elle doit correspondre à des différences chimiques fondamentales entre la paroi des bactéries à Gram positif et celle des bactéries à Gram négatif. C'est bien ce que nous avons vu plus haut. Mais le rôle de cette constitution chimique au cours de la réaction n'est apparu clairement qu'à la lumière d'expériences relativement récentes.

Lorsque des bactéries à Gram positif sont colorées par la méthode de Gram puis soumises à l'action du lysozyme, les protoplastes obtenus sont également colorés en violet. Le siège de la coloration se situe donc au niveau du cytoplasme. Les protoplastes traités par l'alcool se décolorent instantanément. Dès lors apparaît une explication logique du phénomène : la paroi des bactéries à Gram positif constitue un rempart, une barrière interdisant le passage de l'alcool ; celle des bactéries à Gram négatif autorise ce passage et le cytoplasme coloré en violet se décolore. La coloration de Gram traduit donc bien une différence de structure pariétale chez les bactéries en même temps qu'une différence fonctionnelle.

2.2.5. Biosynthèse

Elle se déroule avec le concours d'enzymes cytoplasmiques et membranaires. Ce qui est le mieux connu concerne la synthèse du peptidoglycane, structure principale et essentielle de la paroi bactérienne. Strominger en a décrit les trois étapes.

Au cours d'un premier stade *(fig. II.21)*, l'élément de base qui se répète dans la structure de la chaîne centrale, un **N-acétyl-muramylpentapeptide**, est synthétisé sous la forme de son dérivé UDP à partir de ses précurseurs, la N-acétylglucosamine, le phosphoénolpyruvate et les cinq acides aminés. La dernière réaction greffe à l'extrémité de la chaîne tripeptidique un dipeptide D-alanyl-D-alanine qui se forme indépendamment à partir de deux D-alanines et d'ATP. La formation de ce dipeptide peut être inhibée par un antibiotique, la **cyclosérine**, un analogue structural qui entre en compétition avec la D-alanine. L'ensemble du cycle se déroule dans le cytoplasme.

Dans la deuxième étape *(fig. II.22)* intervient un intermédiaire lipidique, le **undécapényl-phosphate** fixé à la membrane par son extrémité non polaire et qui sert de bras pour accepter puis céder, sur son extrémité polaire, le groupe osidique de l'UDP-acétylmuramylpentapeptide. La N-acétylglucosamine, apportée sous forme d'UDP-acétylglucosamine, s'y associe pour donner naissance au disaccharide répétitif de la chaîne, le N-acétylmuramylpentapeptide-β-1-4-

Copyrighted material

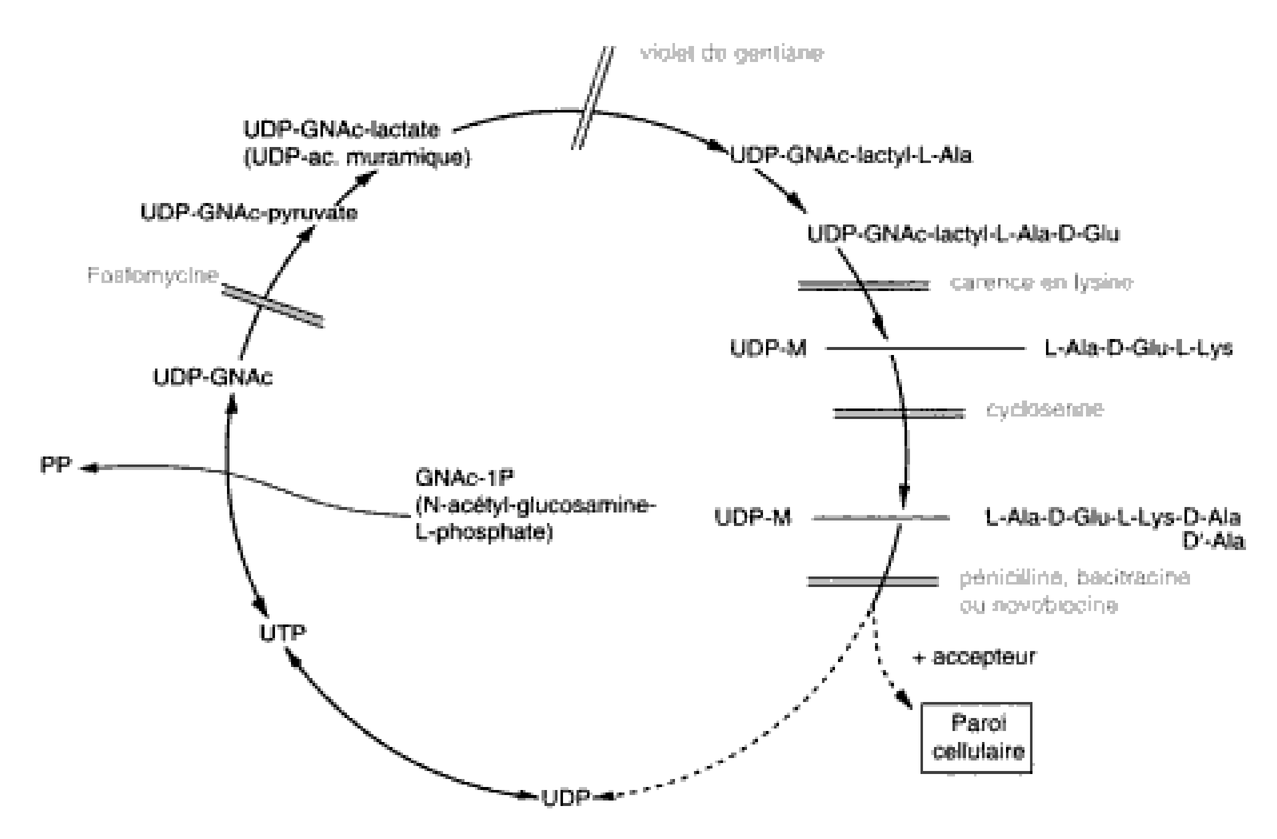


Figure II.21 – **Synthèse de peptidoglycane de paroi chez *Staphylosoccus aureus*.**

Première étape endocellulaire : elle conduit à la formation du précurseur, l'UDF-N-acétylmuramylpentapeptide *(Strominger, 1962)*. Les doubles traits indiquent les étapes bloquées par les différents inhibiteurs.

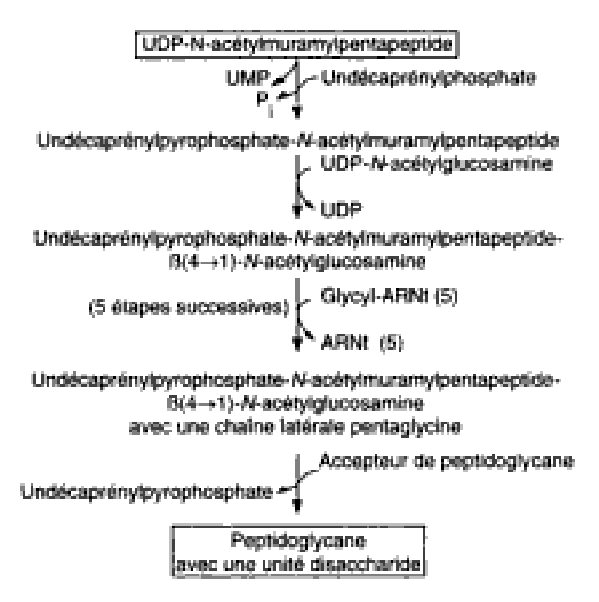


Figure II.22 – **Synthèse de peptidoglycane de paroi chez *Staphylococcus aureus*.**

Deuxième étape membranaire : elle donne naissance au peptidoglycane porteur d'une unité disaccharidique *(Biochimie ; Lehninger Flammarion Médecine-Sciences, Paris, et Worth publishers inc. New York, 1977)*.

N-acétylglucosamine lié à l'undécapényl-phosphate. De courtes chaînes peptidiques sont alors ajoutées au disaccharide pour assurer la réticulation ; elles varient dans leur composition en fonction de l'espèce. Chez *St. aureus*, il s'agit d'un pentaglycocolle. L'unité disaccharidique est ensuite transférée sur l'extrémité en croissance du polymère peptidoglycane au contact de la surface externe de la cellule. L'undécapényl est alors libéré sous forme de pyrophosphate, réaction pouvant être inhibée par un antibiotique spécifique, la **bacitracine**.

Dans la dernière étape, la réticulation entre les chaînes est réalisée par une réaction de transpeptidation pouvant être inhibée par la **pénicilline** qui empêche ainsi la synthèse de paroi, alors que le plus gros du travail a été accompli.

Les dimensions des chaînes varient selon les espèces : elles peuvent comporter de 20 à 100 résidus N-acétylmuramyl-pentapeptide- β-1-4-N-acétylglucosamine.

D'autres substances chimiques peuvent agir au niveau de cette biosynthèse et l'inhiber :

– des colorants tels que le violet de gentiane qui agit dans la première étape *(fig. II.21)* ;

– des antibiotiques tels que la cyclosérine, la bacitracine et la pénicilline déjà citées ainsi que la **novobiocine** qui intervient comme la bacitracine au niveau de la deuxième étape *(fig. II.22)*.

2.2.6. Bactéries sans paroi rigide : les mycoplasmes

Découvertes en 1898, ces bactéries ont d'abord été appelées PPLO *(pleuro-pneumonia-like-organism)* parce que leur premier représentant était responsable de la pleuro-pneumonie des bovidés. Ces micro-organismes sont maintenant appe-

Copyrighted material

lés *My. pneumoniae*. Le groupe s'est largement étendu et de très nombreuses espèces ont été décrites, responsables d'infections chez l'animal ou faisant partie de flores normales des muqueuses de l'homme. Ce sont des cellules sans paroi rigide, de forme globuleuse plus ou moins allongée et de très petite taille (0,1 µm). En raison de ces dimensions minuscules et de leur plasticité, elles sont capables de traverser des filtres retenant habituellement les bactéries, d'où leur nom, virus filtrants, qui leur a été attribué à tort durant de nombreuses années. Leur enveloppe externe comprend une membrane unique à triple feuillet dépourvue de véritable paroi cellulaire.

Du fait de cette absence de peptidoglycane, ces microorganismes sont très sensibles à la pression osmotique, aux détergents et à l'alcool, mais ils sont évidemment insensibles aux agents antibactériens dirigés spécifiquement contre la paroi.

On peut les cultiver sur des milieux complexes contenant en particulier du liquide d'ascite ou du sérum animal mais, jusqu'à présent, les substances permettant leur croissance n'ont pas été isolées. On sait simplement qu'elles utilisent le cholestérol présent dans le sérum pour l'élaboration de leur membrane. Sur des milieux solides convenables, elles forment des colonies *(fig. II.23)* ou, plutôt, des masses cytoplasmiques d'aspect indéfini et varié, parfois globuleuses avec des zones granuleuses.

À partir de 1935, on a isolé des bactéries sans paroi dérivant spontanément de nombreuses espèces bactériennes et que l'on a appelées forme L *(like)* en raison de leur ressemblance avec les PPLO. Ensuite, on a pu induire au laboratoire l'apparition de formes L par sélection sur des milieux à concentration sublétale en antibiotique antiparoi (tel que la pénicilline) et à concentration saline équilibrante.

Les analogies entre mycoplasmes et formes L sont évidentes. Ainsi, on tendrait actuellement à considérer ces bactéries comme des formes L « naturelles » apparues dans des conditions particulières de milieu puis stabilisées et définitivement fixées, capables de se reproduire en l'absence de paroi rigide.



Figure II.23 – *Mycoplasma pneumoniae*. **Microscopie électronique.**

Colonie en microscopie à balayage. *(G. et P. Biberfeld, J. Bact., 1970, 102, 855-861).*

2.3. Membrane cytoplasmique

Son existence peut être déduite d'assez nombreuses observations. Citons tout d'abord la plus simple et la plus ancienne, le phénomène de **plasmolyse**, au cours duquel le cytoplasme d'une bactérie placée en milieu hypertonique se rétracte, ce qui ne peut s'expliquer que par l'existence d'une membrane. En microscopie électronique, celle-ci est individualisée morphologiquement sur des coupes ultrafines. Mieux encore, des membranes peuvent être isolées par centrifugation différentielle à partir de protoplastes lavés puis lysés en milieu isotonique.

2.3.1. Mise en évidence et composition chimique

Les membranes cytoplasmiques isolées et observées au microscope en contraste de phase présentent un aspect homogène, de faible densité. Leur structure, révélée sur les coupes ultrafines examinées en microscopie électronique, est conforme en tous points à l'***unit membrane***, ou membrane de base. Elles ont une épaisseur de 7,5 nm environ et comportent un feuillet interne transparent de nature lipidique pris en « sandwich » entre deux feuillets denses, opaques aux électrons, de nature protéique.

L'analyse chimique de ces membranes révèle trois types de substances : des lipides, des protéines et des glucides. Les molécules lipidiques sont de loin les plus abondantes. Pourtant, les protéines sont de plus grosses molécules et, en poids, elles dépassent nettement les premières : les proportions sont environ de 60 à 70 % de protéines et de 30 à 40 % de lipides.

Les protéines existent sous de très nombreuses formes, une centaine d'espèces protéiques ayant été reconnues. Les glucides (glucose, glucosamine, etc.), faiblement représentés, sont quantitativement des constituants mineurs.

Dans une membrane donnée, il n'existe que quelques espèces de lipides, chacune reproduite à de très nombreux exemplaires. Le cholestérol n'est jamais rencontré chez les bactéries, exception faite des **mycoplasmes**. On n'y décèlera que des phospholipides, en particulier le phosphati-

Copyrighted material

dylglycérol et/ou la phosphatidyléthanolamine (PE).

Les membranes des bactéries à Gram positif contiennent l'un de ces composants, ou les deux, avec plusieurs autres substances de nature voisine telles que l'acide phosphatidique et le diphosphatidylglycérol, tandis que les membranes des bactéries à Gram négatif ne renferment qu'un seul ou deux types de molécules lipidiques.

La membrane cytoplasmique contient surtout les **enzymes de la chaîne respiratoire**, c'est-à-dire les déshydrogénases et les coenzymes qui leur sont fonctionnellement associées : NAD^+, FAD, cytochromes, cytochromes oxydases.

D'autres enzymes impliquées dans la synthèse des lipides complexes, dans les constituants de paroi et dans la réplication de l'ADN y sont localisées.

2.3.2. Structure

Les lipides sont à la base de la structure de la membrane. Chaque molécule lipidique est amphipathique (ou amphiphile) ; elle est caractérisée par une partie hydrophobe soluble dans l'huile, insoluble dans l'eau, et une partie hydrophile ayant les propriétés opposées et porteuse d'un groupement phosphate chargé négativement. Compte tenu de la solubilité incompatible de leurs groupements, les molécules s'organisent spontanément en deux couches moléculaires, le **double feuillet**. Les parties hydrophobes se font face et sont protégées du milieu aqueux tandis que les têtes hydrophiles externes y sont immergées. On retrouve ainsi l'architecture générale de toutes les membranes faites de deux couches hydrophiles séparées par une couche hydrophobe. Cette organisation se présente à grande échelle avec la membrane cytoplasmique ou à petite échelle au cours de la formation de vésicules cytoplasmiques. Elle empêche le passage des molécules hydrophiles et constitue ainsi une véritable barrière imperméable à ces substances.

La structure bimoléculaire de la membrane cytoplasmique n'est pas statique ; elle est conforme au modèle dit en **mosaïque fluide** proposé par Singer. Chaque couche monomoléculaire représente un fluide à deux dimensions où les

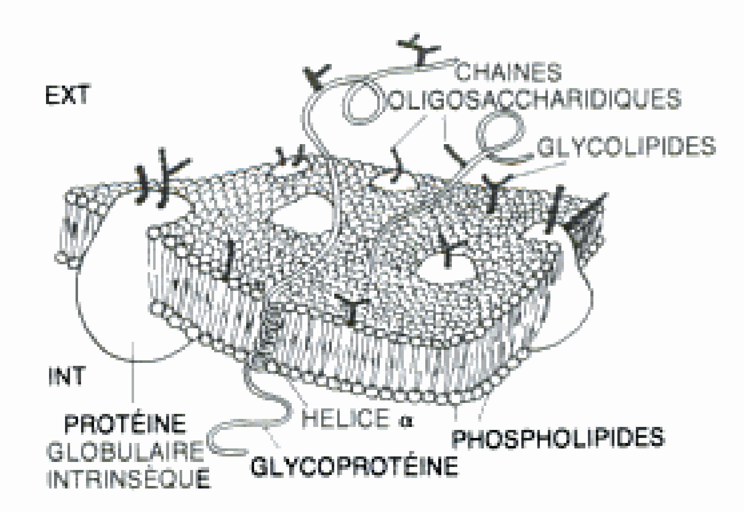


Figure II.24 – **Structure schématique de la membrane cytoplasmique.**
Modèle de la mosaïque fluide (pour la clarté du schéma la taille des phospholipides est exagérée par rapport aux protéines.

molécules peuvent se déplacer latéralement en échangeant leurs positions à très haute fréquence (1 million de fois par seconde) *(fig. II.24)*.

Comme dans toutes les membranes, on distingue dans la membrane cytoplasmique deux catégories de protéines : les protéines extrinsèques et les protéines intrinsèques. Les **protéines extrinsèques**, encore appelées protéines périphériques, sont liées faiblement à la membrane (liaisons électrostatiques) ; elles apparaissent sur une des deux faces du double feuillet et n'ont aucun groupement inséré dans la zone hydrophobe. Les **protéines intrinsèques** ou internes (probablement toutes) traverseraient complètement le double feuillet membranaire pour apparaître sur les deux faces, interne et externe, de la membrane.

2.3.3. Fonction

Indépendamment de son rôle dans le processus de biosynthèse (par les enzymes qui sont localisées à son niveau) et dans l'excrétion d'enzymes hydrolytiques (espace périplasmique), la membrane joue un rôle essentiel dans la respiration et dans les transferts de substances.

2.3.3.1. *Respiration cellulaire*

Les **chaînes respiratoires** de la membrane bactérienne sont semblables à celles des mitochondries ; à titre d'exemple, celle d'*E. coli* est représentée sur la *figure II.25* ; elle fait intervenir le

Copyrighted material

FAD, une hétéroprotéine fer-soufre, une quinone et deux cytochromes (b et o). La chaîne respiratoire est à l'origine d'un **gradient électrochimique** (voir chap. IV) ; chez *E. coli*, ce gradient se caractérise par une forte concentration externe de protons (différence de pH d'environ 2 unités) et par une différence de potentiel de 70 mV. La phosphorylation est assurée grâce à la **force proton-motrice** de ce gradient de protons par l'intermédiaire d'un système de deux protéines membranaires, F_0 et F_1, qui forment l'ATPase responsable de la **réaction de phosphorylation**.

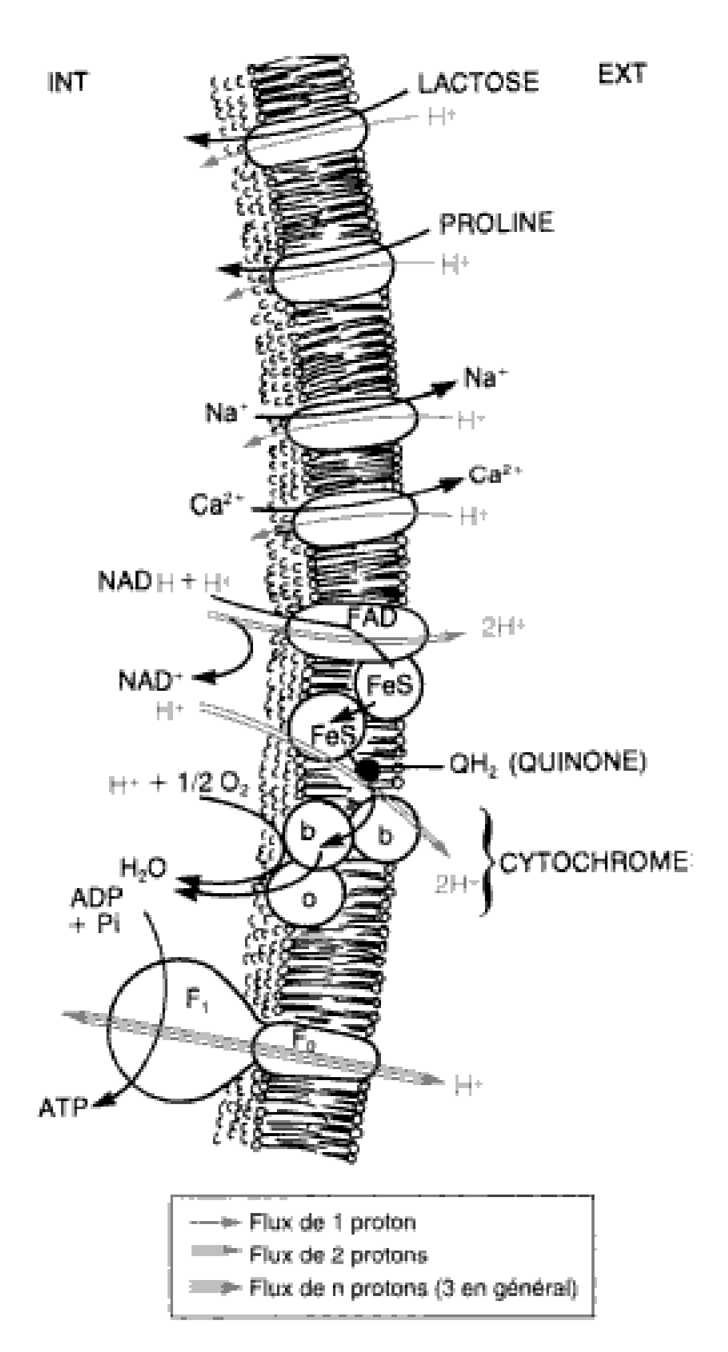


Figure II.25 – **Quelques fonctions de la membrane cytoplasmique d'*E. coli*.**

2.3.3.2. Transfert de substances

La membrane cytoplasmique joue le rôle de barrière en empêchant, d'une part, la fuite des composés intracytoplasmiques quel que soit leur poids moléculaire et, d'autre part, les pénétrations anarchiques des constituants extracellulaires. C'est elle, aussi et surtout, qui assure les échanges en absorbant les éléments utiles au métabolisme, en excrétant d'autres molécules et en éliminant les déchets. Elle régit donc l'entrée et la sortie des métabolites. Perméable à l'eau et à de nombreuses molécules, elle sélectionne le passage de certaines petites molécules organiques et empêche celui des composés macromoléculaires.

2.3.3.2.1. Diffusion

Avec de petites molécules hydrophobes (O_2, N_2...) ou polaires non chargées (H_2O, urée, CO_2...), la membrane se comporte comme un système physique ordinaire, assurant les échanges au même titre qu'une membrane inerte. La loi de Fick, qui définit le mouvement des molécules en milieu inerte, peut rendre compte du phénomène. Le flux moléculaire s'oriente des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées pour tendre finalement vers un état d'équilibre où les taux de substances sont égaux. Par ailleurs, la vitesse de passage sera linéairement proportionnelle à la concentration extérieure. Il s'agit donc d'une **diffusion simple passive** *(fig. II.26a)*.

Pour les molécules de taille plus importante et hydrophiles, la diffusion dans le sens du gradient de concentration peut se faire de deux manières :

– **diffusion passive** par canal protéique *(fig. II.26b)* ;

– **diffusion facilitée** par protéine porteuse *(fig. II.26c)*.

La différence essentielle entre les deux tient au fait que dans le cas de la protéine porteuse, celle-ci subit un changement de conformation lors du transport et n'est accessible que sur une de ses deux faces (cytoplasmique ou externe) à la fois. Par contre, le canal protéique n'implique pas ce changement de structure, et ceci entraîne des vitesses de transfert beaucoup plus importantes.

Chez les bactéries à Gram négatif, ces canaux protéiques sont limités à la membrane externe (voir 2.2.3.3.1, porines) et ils sont fort peu spécifiques.

Copyrighted material

2.3.3.2.2. Transport actif

La pénétration par diffusion simple ou facilitée ne peut expliquer à elle seule les échanges cellulaires. Les bactéries, comme les autres types cellulaires, admettent et concentrent sélectivement certaines substances et en rejettent d'autres. Ceci leur permet d'assurer, d'une part, l'équilibre chimio-osmotique de part et d'autre de la membrane et, d'autre part, la pénétration de substances contre un gradient de concentration. Dans tous les cas, les mécanismes de transfert nécessitent un apport énergétique et sont regroupés sous la dénomination **transport actif**.

• **Transports ioniques**. Les transferts ioniques sont assurés par des systèmes ATPases où un couplage chimio-osmotique permet le transfert de l'ion de façon concomitante à l'hydrolyse d'ATP. Chez les bactéries, des ATPases assurent ainsi le transfert des ions K^+. L'ATPase K^+ est une protéine intramembranaire de 70 à 100 kd ; elle fait pénétrer les ions K^+ à l'intérieur de la cellule. Ce système est appelé **transport actif primaire** ou **uniport** *(fig. II.26d)*.

• **ATPases non ioniques**. D'autres ATPases sont présentes chez les bactéries à Gram négatif (possédant une membrane externe). Elles sont non ioniques et assurent une étape du transport spécifique de molécules lors de la traversée du périplasme et de la membrane cytoplasmique. Ce système couple le transport de nombreux solutés organiques (sucres, acides aminés) à l'hydrolyse de l'ATP. Les solutés ayant traversé la membrane externe par l'intermédiaire des porines sont pris en charge par des transporteurs spécifiques appelés protéines « de liaison de substrat » ou protéines « affines » *(fig. II.27)*. Ces protéines ayant fixé le

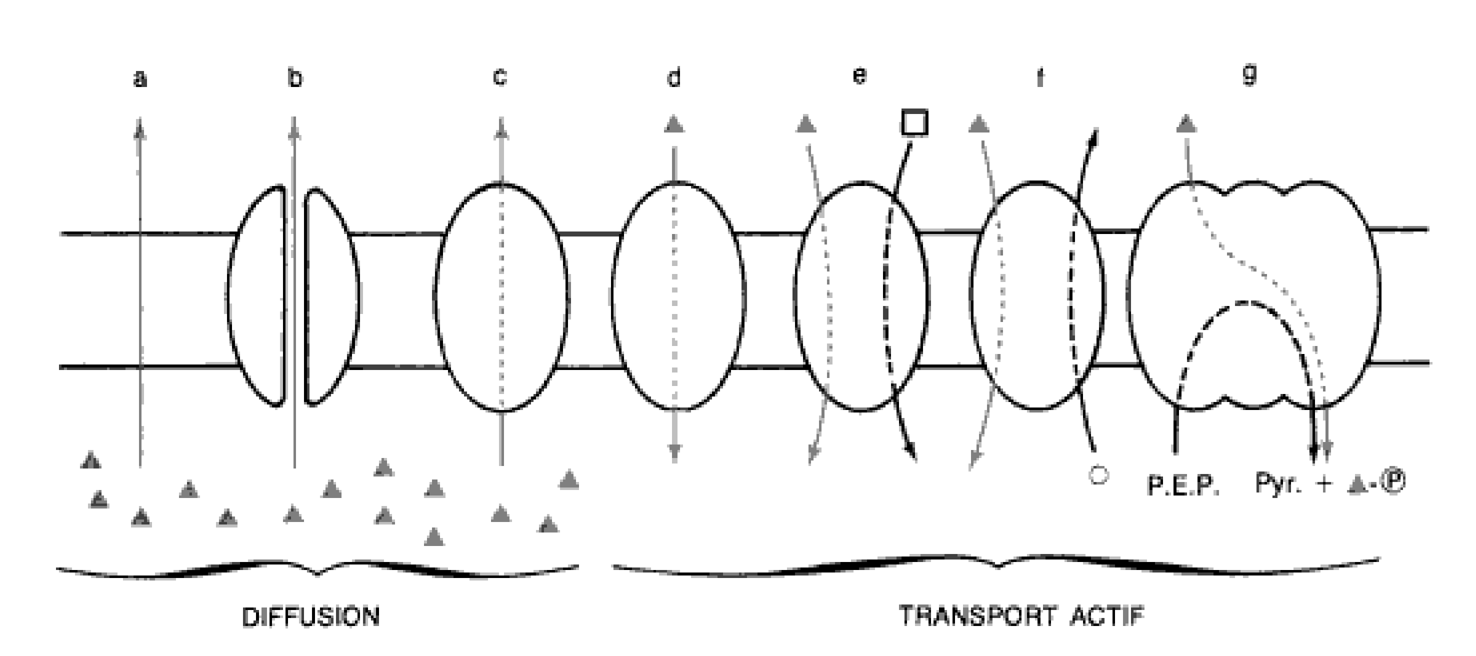


Figure II.26 – **Les différents modes de pénétration des substances à travers la membrane cytoplasmique.**

a : diffusion passive transmembranaire ;
b : diffusion passive par canal spécifique ou non spécifique ;
c : diffusion facilitée par protéine porteuse ;
d : transport actif primaire (uniport) ;
e : cotransport actif (symport) ;
f : cotransport actif (antiport) ;
g : transport par translocation de groupe ;
▲ : molécules à transporter ;
□○ : molécules de cotransport ;
PEP : phosphoénolpyruvate ;
pyr : pyruvate.

Copyrighted material

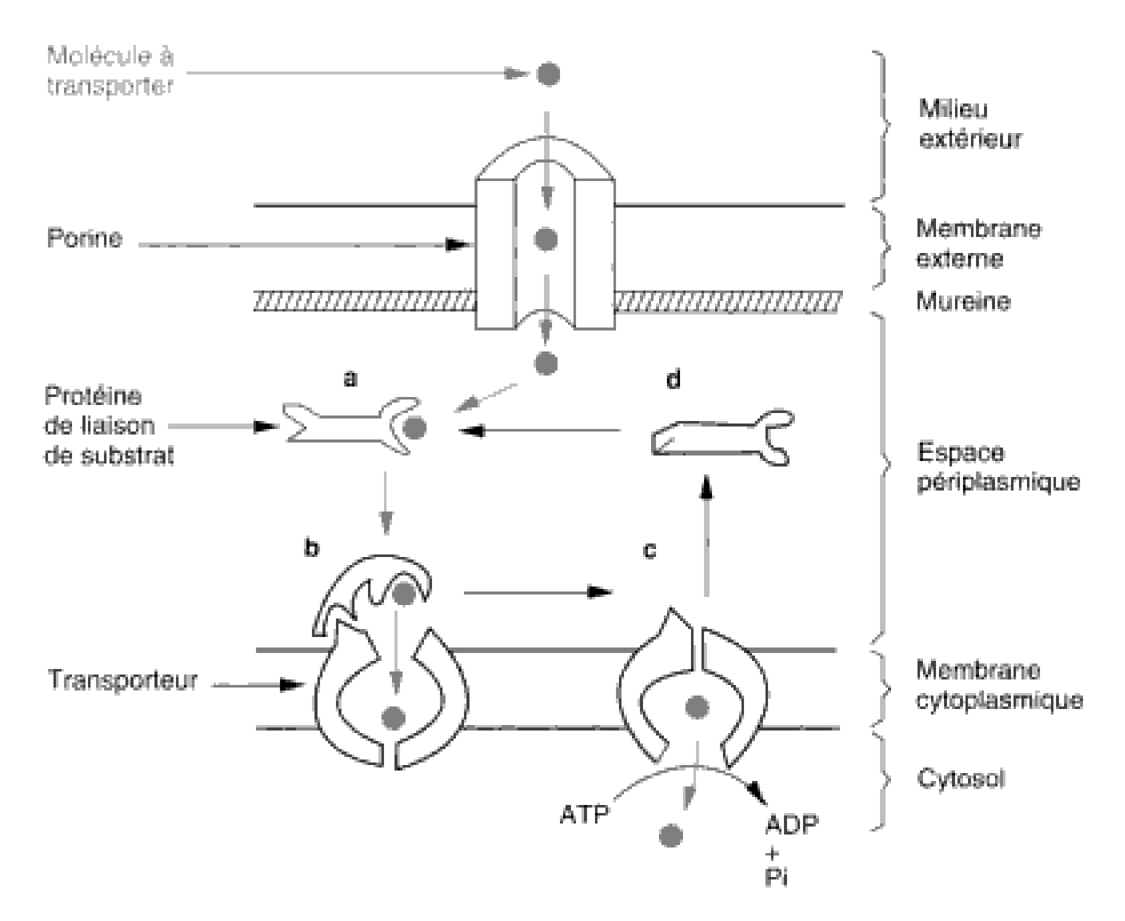


Figure II.27 – **Protéines périplasmiques « de liason de substrat » ou protéines « affines ».**

a : fixation de la molécule à transporter par la protéine de liaison de substrat ;

b : changement de confirmation et liaison au transporteur protéique membranaire ;

c : passage de la molécule dans le cytosol et libération de la protéine de liaison de substrat. Activité ATPasique ;

d : protéine de liaison de substrat à nouveau libre et dans sa conformation prête à prendre en charge une autre molécule.

soluté subissent alors un changement de conformation leur permettant de se fixer au transporteur protéique de la membrane cytoplasmique. Ce dernier possède une activité ATPasique apportant ainsi l'énergie nécessaire pour le transfert du soluté dans le cytoplasme. Il s'agit là encore d'un type de transport actif primaire ou « uniport » *(fig. II.26d)*.

• **Transport par « translocation de groupe »**. Chez les bactéries, un autre système d'hydrolyse d'un composé phosphorylé (autre que l'ATP), le phosphoénolpyruvate (PEP), permet le transport de nombreux sucres à travers la membrane. Ce transfert s'accompagne d'une phosphorylation du soluté. Ce système est appelé « translocation de groupe » ou « phosphoénolpyruvate phosphotransférase » *(fig. II.26g)*.

• **Système ATP synthétase**. D'autres systèmes de transport ioniques sont couplés à des transferts d'électrons. C'est le cas de la chaîne respiratoire membranaire (voir chap. IV). Le transfert des électrons le long de cette chaîne entraîne une sortie active de protons créant ainsi un gradient (H^+ ext. H^+ int.). Celui-ci permet à son tour, par transport vers l'intérieur des protons, la synthèse d'ATP par un système de couplage osmochimique (diffusion de protons-synthèse d'ATP). La rentrée des H^+ se fait par une protéine membranaire à activité ATP synthétase. Elle est constituée de deux parties, F_0 et F_1. F_0 (M : 147 kd) est intramembranaire et assure le transfert des protons. F_1 (MM : 381 kd) est soluble, se détache facilement de la membrane et est située du côté cytoplasmique ; elle est responsable de l'activité ATP synthétase. On retrouve ce système chez certaines bactéries anaérobies strictes (tel *Propionigenium modestum*) où, cette fois-ci, il s'agit du transfert d'ions Na^+. Un gradient, par sortie active de Na^+, est assuré par des décarboxylases membranaires. Il permet la rentrée de ces ions couplée à la syn-

Copyrighted material

thèse d'ATP. Une protéine membranaire, à activité ATP synthétase du même type que la précédente, assure ce mécanisme.

• **Cotransports** : **« symport » et « antiport »**. Le transport de nombreuses substances est couplé à un gradient ionique. Ce système, appelé **transport actif secondaire**, assure le transfert de solutés comme les sucres (lactose) ou des acides aminés (proline). C'est un système dit de cotransport, le transfert des ions, dits ions moteurs, entraînant le cotransport du soluté en question *(fig. II.26e et f)*. Il peut avoir lieu dans le même sens (**symport** : entrée de lactose-entrée de H^+ ; entrée de proline-entrée de H^+) ou en sens opposé (**antiport** : sortie de Ca^{++}-entrée de H^+ ; sortie de Na^+-entrée de H^+). La « β-galactoside perméase » d'*E. coli* en est un exemple bien connu. C'est une protéine très hydrophobe intramembranaire de 417 acides aminés. Elle assure la pénétration du lactose en symport avec la pénétration d'ions H^+ (permise par la présence d'un fort gradient protonique). La cinétique de transport a un comportement michaelien (d'où le nom « perméase » donné à ce type de mécanisme). Pour une valeur bien définie du potentiel électrochimique du proton, on détermine les constantes cinétiques V_{max} et Kt (constante de transport par analogie à Km, constante de Michaelis). La stœchiométrie de transfert généralement admise est de 1/1. Le système contribue à l'accumulation du lactose, mais en réalité, étant utilisé, il ne s'accumule pas, l'avantage essentiel du système étant d'accélérer la vitesse de transport. D'autres systèmes protéiques de transport de type perméase ont été identifiés, telle l'α-galactoside-perméase chez *E. coli* où les ions « moteurs » peuvent être variés (H^+, Na^+, Li^+). De même, on a pu mettre en évidence des transporteurs protéiques de type perméase pour le xylose, l'arabinose, le mannose et les acides aminés.

• **Exportation de protéines**. Enfin, l'exportation de protéines synthétisées dans le cytoplasme de la bactérie reste un problème à l'étude. Ces protéines peuvent avoir deux destinées ; soit être excrétées par la bactérie (toxines, exoenzymes…), soit être destinées aux membranes (protéines intrinsèques…). Il semble que, dans tous les cas, elles soient synthétisées avec, du côté N terminal, une séquence supplémentaire, clivée par la suite, pour donner la protéine mature. Cette séquence, appelée séquence signal, aurait un rôle essentiel dans la liaison de la protéine avec le côté cytoplasmique de la membrane, première étape du transfert. Ensuite, par l'intervention de protéines appelées **protéines chaperons**, la protéine à transférer acquerrait une structure **compétente** permettant la traversée de la membrane ou **translocation**. Les protéines intrinsèques, elles, auraient un système incomplet ne leur permettant pas de traverser complètement la membrane. Ces mécanismes sont à rapprocher de ceux, mieux connus, du transfert de protéines à l'intérieur du réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes.

2.3.4. Histoire d'un artefact : les mésosomes

Outre la membrane cytoplasmique qui limite le contenu intracellulaire de la bactérie, l'existence de structures membranaires intracytoplasmiques, appelées **mésosomes** *(fig. II.28)*, est le fruit d'observations datant des années 1955-1960. Ces mésosomes apparaissaient, en microscopie électronique, comme des expansions ou des invaginations de la membrane, de structure vésiculaire, tubulaire ou lamellaire. Ils étaient visibles chez les bactéries à Gram positif *(Bacillus)*, mais rarement chez les bactéries à Gram négatif. On pouvait les extraire de la membrane par action du lysozyme en milieu hypertonique. Leur composition chimique n'était cependant pas fondamentalement différente de celle de la membrane elle-même.

D'autres observations plus récentes, à partir de préparations **congelées** très rapidement et **cryodécapées**, donc sans étape de fixation chimique, ont montré que ces structures n'étaient plus visibles. Elles réapparaissent dès que l'on utilise des techniques incluant des temps de fixation relativement longs au tétroxyde d'osmium notamment.

Elles apparaissent donc comme des artefacts de préparation. S'il est difficile de nier totalement leur existence sur les photos, on peut affirmer qu'elles ne possèdent certainement pas l'aspect observé en microscopie électronique ni le rôle physiologique qu'on leur a attribué dans la respiration cellulaire.

Copyrighted material



Figure II.28 – **Artéfact. Mésosomes vue en microscopie électronique.**
(Insitut Pasteur de Lille, A. Petitprez et coll.) ; *Mycobacterium phlei* ; noter la structure tubulaire et les liaisons avec la membrane cytoplasmique au moment de la diviision ; × 30 000.

2.3.5. Biosynthèse de la membrane

Les synthèses des protéines et des lipides sont indépendantes. Celle des phospholipides a lieu dans le cytoplasme et semble être soumise à une certaine régulation par la température de croissance et selon la phase de croissance (voir chap. III). Cependant, aucun mécanisme précis n'a encore été décrit. Celle des protéines a lieu au niveau de polysomes liés à la membrane cytoplasmique. Elles sont ensuite intégrées (voir § 2.3.3.2.2.). C'est au niveau de cette biosynthèse qu'agiraient des antibiotiques spécifiques comme la polymyxine (voir chap. V).

2.4. Cytoplasme

Le cytoplasme est un hydrogel colloïdal comprenant une phase dispersante constituée par une solution de sels minéraux et de composés solubles de nature lipoprotéique, une phase dispersée formée de nucléoprotéines et de lipides. Son pH est situé entre 7 et 7,2. En dehors du matériel nucléaire, les principaux éléments constitutifs du cytoplasme sont les ribosomes et les acides ribonucléiques, les substances de réserve et, enfin, certains **organites** spécialisés.

2.4.1. ARN et ribosomes

Les **ribosomes** sont de petites granulations sphériques de 10 à 30 nm de diamètre qui paraissent remplir totalement le cytoplasme, excepté les régions nucléaires. Ils fixent les colorants basiques comme le bleu de méthylène. Leur constante de sédimentation est de 70 S pour une masse molaire de 3.10^6 daltons. Ces particules peuvent se dissocier en deux sous-unités lorsqu'on les centrifuge en l'absence d'ions Mg^{++} : les unes, les plus volumineuses, ont une constante de sédimentation de 50 S et une masse molaire de 2.10^6 daltons ; les autres, de 30 S, ont une masse plus faible de 1.10^6 daltons.

Les ribosomes sont constitués exclusivement d'ARN (63 %) et de protéines (37 %). Les cellules bactériennes en contiennent des quantités variables. Celles d'*E. coli* en révéleraient 18 000 environ. L'ARN des ribosomes représente de 80 à 90 % de l'ARN total cellulaire. Il est caractérisé surtout par son manque de spécificité puisque, quelles que soient les espèces bactériennes, la séquence des bases constitutives est la même.

Chaque sous-unité possède son ARN et ses protéines propres :

– ARN 16S et protéines S (*small*, ou petit) pour la sous-unité 30 S ;

– ARN 23S et 5S et protéines L (*large*, ou grande) pour la sous-unité 50 S.

Chaque **sous-unité 50 S** est donc reliée à une **sous-unité 30 S** par l'intermédiaire de liaisons ARN-protéine et protéine-protéine.

L'association particulière dans la sous-unité 50 S de l'ARN et des protéines L détermine deux sites spécifiques qui jouent un rôle précis au cours de la traduction des chaînes d'ARN en protéines. Ces sites sont appelés sites P (comme peptidyl) et A (comme aminoacyl).

Les ribosomes sont en effet le siège de la biosynthèse des protéines. C'est à leur niveau que les acides aminés s'unissent les uns aux autres par liaison peptidique pour former une chaîne poly-

Copyrighted material

peptidique. Il est établi que les particules de ribosomes sont souvent associées par une chaîne d'ARN messager, réalisant ainsi des structures en chapelet qu'on appelle des **polysomes**.

2.4.2. Granulations et substances de réserve

La bactérie peut accumuler des matériaux organiques ou inorganiques constituant généralement des réserves d'énergie. Lorsque ces substances atteignent une taille suffisante, elles forment des **granulations**, lesquelles sont visibles quelquefois au microscope. D'une façon générale, chaque espèce ou chaque groupe bactérien synthétise une seule catégorie de substance.

Dans un milieu déficient en azote et riche en substrat carboné, l'énergie inutilisable pour la synthèse des protéines sert à la transformation du carbone assimilé en polymère de réserve. Les substances accumulées sont soit de l'**amidon**, soit beaucoup plus fréquemment du **glycogène** *(fig. II.29)*. Il est facile de révéler leur présence avec une solution iodo-iodurée qui colore les polymères non ramifiés du glucose (amidon) en bleu foncé et les polymères ramifiés (glycogène) en brun rougeâtre. L'accumulation de glycogène est fréquente chez les entérobactéries, les *Clostridium*, etc.

D'autres espèces appartenant aux genres les plus divers, *Pseudomonas, Vibrio, Micrococcus, Sphaerotilus*, etc., synthétisent de l'**acide poly-β-hydroxybutyrique**, composé macromoléculaire fixant les colorants spécifiques des graisses comme le noir Soudan et facilement mis en évidence au microscope électronique. Quelques bactéries peuvent accumuler les deux types de matériels de réserve. Tel est le cas des bactéries pourpres, les *Sphaerotilus*, comme le montrent les photos des *figures II.30a et b*.

Les **granulations métachromatiques** ou de **volutine** sont ainsi appelées parce qu'elles prennent une coloration rouge pourpre en présence de certains colorants basiques comme le bleu de toluidine. Elles sont constituées par des polyphosphates inorganiques (polymères linéaires d'orthophosphate). Leur recherche chez certaines espèces pathogènes *(C. diphterieae)* a été mise à profit



Figure II.29 – **Substances de réserve.**
Glycogène chez *Sphaerotilus natans (Institut Paster de Lille, A. Petitprez et coll.)*. Coupes en microscopie électronique ; coloration de Thiery. Noter les agrégats répartis uniformément, × 20 000.

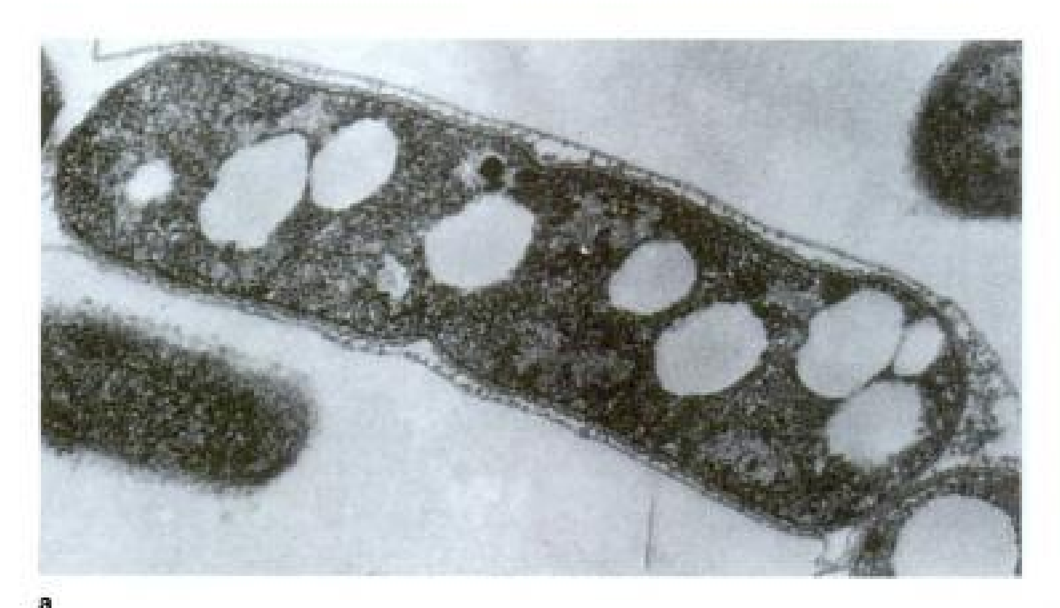
dans le passé dans un but diagnostique. Sur un frottis, on peut en effet les mettre en évidence par les colorations d'Ernst-Neisser ou de Del Vecchio.

Des inclusions de **soufre** ou de **fer** sont aussi caractéristiques de certains groupes bactériens : les thiobactéries telles que les *Beggiatoa* et les *Thiothrix*, qui tirent leur énergie de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré ; les sidérobactéries dont les gaines sont incrustées d'hydroxyde de fer et le cytoplasme parsemé d'inclusions du même type. Le fer peut également être présent sous forme d'oxyde (Fe_3O_4) chez les bactéries dites magnétiques, inclus dans des vacuoles appelées **magnétosomes**. Ces espèces, de découverte récente (1975), peuvent être déplacées dans un champ magnétique, d'où leur nom.

2.4.3. Chromatophores et pigments

Chez les algues et les plantes supérieures, c'est au niveau des **chloroplastes** que s'effectue la photosynthèse, ce mécanisme qui préside à la conversion de l'énergie lumineuse émise par le soleil en énergie chimique. Chez les bactéries photosynthétiques, les organites spécialisés qui remplissent ce rôle sont appelés **chromatophores** en raison, d'une part, de leur ultrastructure différente de celle des chloroplastes et, d'autre part, de la nature des pigments photosynthétiques. Dans le premier cas, il s'agit en effet de chlorophylle tandis que dans le second, les pigments chlorophylliens ont

Copyrighted material


a

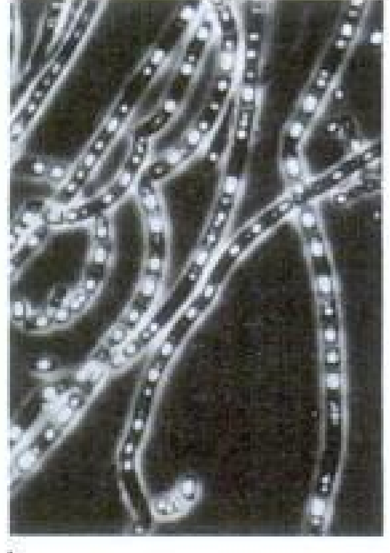

b

Figure II.30 – **Substances de réserve : granulations de poly-β-hydroxybutyratte chez *Sphaerotilus natans*.**

a : Microscopie optique contraste de phase × 1 080 (dû à l'obligeance de E. G. Mulder et V.L. Van Veen) ;
b : Microscopie électronique, × 25 000 *(Institut Pasteur de Lille, A. Petitprez et coll.)*.

une composition chimique légèrement différente : on les appelle des **bactériochlorophylles**.

Chez les bactéries pourpres, les chromatophores sont entourés d'une membrane de type unitaire, probablement dérivée de la membrane cytoplasmique et en liaison régulière avec elle. Ces systèmes membranaires, vus en microscopie électronique, sont de type vésiculaire ou tubulaire, en amas ou en strates.

Chez les bactéries vertes et chez les *Chlorobium* qui en constituent le genre le plus représentatif, les chromatophores se présentent sous forme de vésicules en forme de cigare de 100 à 150 nm de longueur sur 50 nm de largeur, entourées d'une membrane (non unitaire) totalement distincte de la membrane cytoplasmique. Les vésicules des *Chlorobium* représentent un exemple unique, chez les procaryotes, d'organites photosynthétiques spécialisés. *Halobacterium halobium* (bactérie vivant dans les milieux salés) possède dans sa membrane cytoplasmique de la **bactériorhodopsine**, un pigment voisin des pigments de la rétine de l'œil *(fig. II.31)*.

D'autres pigments peuvent être rencontrés :

– vitamine K_2 (composé quinonique) chez *B. subtilis* et *B. cereus* ;

– caroténoïde protecteur anti-UV chez les corynébactéries ;

– pyocyanine, violacéine de *Chromobacterium violaceum*, pigment ayant une activité antibiotique. Certains enfin confèrent aux colonies bactériennes leur teinte caractéristique ;

– zeaxanthène (caroténoïde), pigment jaune, chez *St. aureus* ;

– xantophylle et sarcinaxanthène (caroténoïdes), pigments rouges, chez *Sarcina* ;

– pyocyanine bleue et pyoverdine bleu-vert fluorescent chez *Ps. aeruginosa* ;

– dérivé pyrolique rouge chez *Serratia marcescens*.

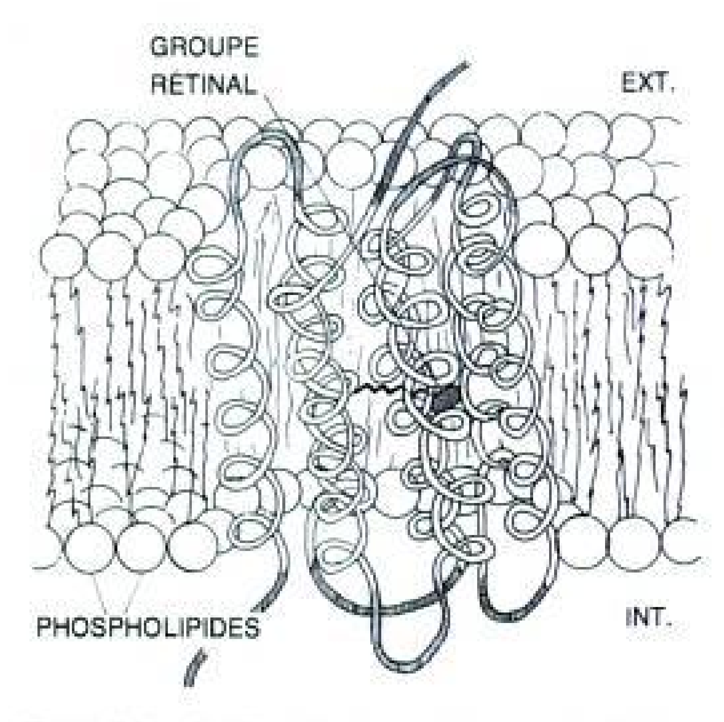


Figure II.31 – **Schéma de la structure de la bactériorhodopsine chez *Halobacterium halobium*.**

Cette glycoprotéine membranaire comporte :
▭ des zones hydrophiles ;
═ des zones hydrophobes.

Copyrighted material

2.4.4. Vacuoles à gaz

Ces vésicules remplies de gaz sont rencontrées chez les membres des trois principaux groupes procaryotes photosynthétiques : algues bleu-vert, bactéries pourpres, bactéries vertes. Elles permettent à ces micro-organismes d'habitat aquatique de flotter et de remonter à la surface de l'eau. Visibles au microscope optique, elles apparaissent comme des corps réfringents, aux contours irréguliers. En microscopie électronique, ces vésicules à gaz sont de forme cylindrique ou cylindro-coniques, entourées d'une membrane à un seul feuillet (non unitaire) d'environ 5 nm d'épaisseur. La prolifération anarchique de ces bactéries se produit quelquefois à la surface des lacs ou des océans. Lorsqu'il s'agit d'algues bleu-vert, on leur donne le nom de « fleurs d'eau ».

2.5. Appareil nucléaire

Pendant de nombreuses années, les essais de mise en évidence d'un appareil nucléaire chez les bactéries se sont révélés infructueux ; la présence d'acide ribonucléique en quantité extrêmement importante dans le cytoplasme bactérien masque en effet l'acide désoxyribonucléique lors de sa coloration par les colorants basophiles. Actuellement, il est amplement démontré que toutes les bactéries contiennent des corps intracellulaires que l'on distingue parfaitement des structures cytoplasmiques ; ils possèdent les propriétés chimiques que l'on reconnaît aux noyaux des cellules eucaryotes et se divisent en harmonie avec la cellule.

2.5.1. Mise en évidence et morphologie

Ce sont en premier lieu les techniques cytochimiques qui ont permis cette mise en évidence. L'une des premières et des plus spécifiques, celle de Stille et Piekarski, utilise la réaction de Feulgen. Les bactéries sont traitées par l'acide chlorhydrique dilué qui dégrade partiellement l'ADN en libérant son désoxyribose constitutif et les fonctions aldéhydes libres de ce pentose. En présence de fuchsine décolorée par le bisulfite de sodium (réactif de Schiff), les résidus aldéhydiques sont colorés spécifiquement en rouge foncé, localisant ainsi l'ADN dont ils sont issus.

On peut aussi éliminer l'acide ribonucléique par hydrolyse enzymatique. C'est la technique de Boivin à la ribonucléase. Après traitement, l'appareil nucléaire peut être mis en évidence à l'aide des colorants basiques usuels comme le bleu de méthylène, la fuchsine basique ou encore grâce à la réaction de Feulgen.

Robinow s'est illustré dans ces études cytologiques en modifiant et en vulgarisant la méthode de Piekarski : les cellules fixées aux vapeurs d'acide osmique et soumises à l'hydrolyse chlorhydrique sont colorées par une solution de Giemsa.

La morphologie des corps observés est variable *(fig. II.32)*. Les aspects sont différents selon la phase de croissance et de division de la bactérie. Chez la plupart des cocci, on observe une petite masse sphérique ou ovoïde ou en massue, plus ou moins centrale. Dans les formes bacillaires, ce sont plutôt des bâtonnets situés transversalement dans la cellule, très fréquemment appariés. Cet aspect en double bâtonnet correspond vraisemblablement à la distribution du matériel nucléaire au cours de la division. Le nombre d'appareils nucléaires par cellule végétative peut varier. Les cocci sont habituellement mononucléaires. Les bacilles sont fréquemment multinucléaires ; ils contiennent alors deux appareils nucléaires ou un multiple de 2 selon le stade de croissance. C'est ainsi que, chez les bactéries jeunes en phase exponentielle de croissance, les cellules multinucléées vont prédominer, l'appareil nucléaire se divisant plusieurs fois avant que la cellule elle-même n'y parvienne. Au contraire, chez les bactéries âgées ou en repos, on ne distingue généralement qu'un seul appareil nucléaire, d'aspect vésiculaire ou sphérique ou légèrement ovalaire.



Figure II.32 – Corps nucléaire chez *Bacillus subtilis*, × 2 000.

Copyrighted material

Que ces corps dits nucléaires, par analogie avec ce que l'on connaissait des cellules des organismes supérieurs, fussent de nature désoxyribonucléique, personne n'en doutait à la suite de ces études démonstratives. D'autres expériences le confirment : ce sont les études d'absorption en UV et celles d'autoradiographie de bactéries ayant incorporé de la thymidine tritiée au cours de leur croissance.

2.5.2. Composition chimique et structure

L'acide désoxyribonucléique est un polymère de poids moléculaire élevé, composé d'unités appelées nucléotides. Chaque nucléotide est constitué d'un groupement phosphoré, d'un sucre à 5 atomes de carbone et d'une base purique ou pyrimidique :

– les bases puriques sont l'**adénine** (A) ou la **guanine** (G), les bases pyrimidiques la **cytosine** (C) ou la **thymine** (T) ;

– le sucre est le désoxyribose ;

– le groupement phosphoré est un phosphate diester en position 3' et 5' du désoxyribose.

Ces nucléotides sont de quatre types selon la nature de la base constitutive. Ils s'unissent les uns aux autres par des liaisons diester établies entre les fonctions acides de l'acide phosphorique et les fonctions alcools du sucre. De longues chaînes polynucléotidiques se constituent ainsi, formant une épine dorsale où alternent régulièrement les molécules de sucre et de phosphate, avec des projections latérales. D'autres données chimiques et physiques complètent les précédentes. Dans tous les ADN d'origine bactérienne, les chaînes sont associées par deux et maintenues par des liaisons hydrogène qui relient les molécules de bases. Selon leur provenance, les polynucléotides diffèrent entre eux par l'ordre de répartition des quatre types de bases A, T, C, G qui s'échelonnent le long de chacune des chaînes. Chaque ADN est ainsi défini par une certaine séquence des bases. Cette séquence détermine sa nature et son originalité.

Watson et Crick ont proposé un modèle pour la molécule d'ADN. Elle est constituée d'une « double hélice enroulée à la manière d'une échelle de corde autour d'un axe imaginaire » :

– les deux chaînes de la double hélice ont des polarités opposées, par rapport aux liaisons 3'-5' des désoxyriboses avec les phosphates. La *figure II.33* concrétise cette donnée fondamentale dont nous verrons l'incidence sur le phénomène de réplication ;

– dans tous les ADN, il existe autant de molécules de thymine que d'adénine et autant de molécules de cytosine que de guanine. Autrement dit, on peut établir les égalités suivantes : A = T et C ≡ G.

C'est le grand principe de l'équivalence ou de la **complémentarité** selon lequel à une adénine correspond toujours une thymine et à une cytosine vient toujours s'apparier une guanine.

En revanche, le rapport (A + T)/(G + C), mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff, varie considérablement suivant les espèces mais reste constant dans toutes les souches d'une même espèce. On l'exprime habituellement en GC %, c'est-à-dire en pourcentage de guanine + cytosine dans l'ADN. Il est environ de 50 % chez *E. coli* ; 30 à 40 % chez les *Proteus*, 25 à 45 % chez les *Clostridium* et 60 à 70 % chez les *Pseudomonas*.

2.5.3. Chromosome bactérien

L'appareil nucléaire n'est **pas entouré d'une enveloppe** contrairement au noyau de la cellule eucaryote.

D'après les observations réalisées essentiellement chez *E. coli* et autres eubactéries voisines, il était admis l'existence d'un seul chromosome par appareil nucléaire. En fait, des observations récentes chez d'autres souches montrent une diversité plus importante (par exemple, la présence de deux chromosomes de tailles différentes chez *Brucella melitensis* ou *Vibrio cholerae*).

Le corps chromatinien présente une structure fibrillaire. Ces fibrilles ont un diamètre de 2 à 6 nm et sont constituées principalement d'ADN. Elles sont enroulées les unes dans les autres en faisceaux.

2.5.4. Chromosome circulaire

Les expériences de transfert génétique et surtout le phénomène de conjugaison (voir chap. VI) ont permis de mieux préciser les fonctions du matériel génétique de la bactérie. Leur analyse laisse supposer que les caractères héréditaires de la bactérie

Copyrighted material

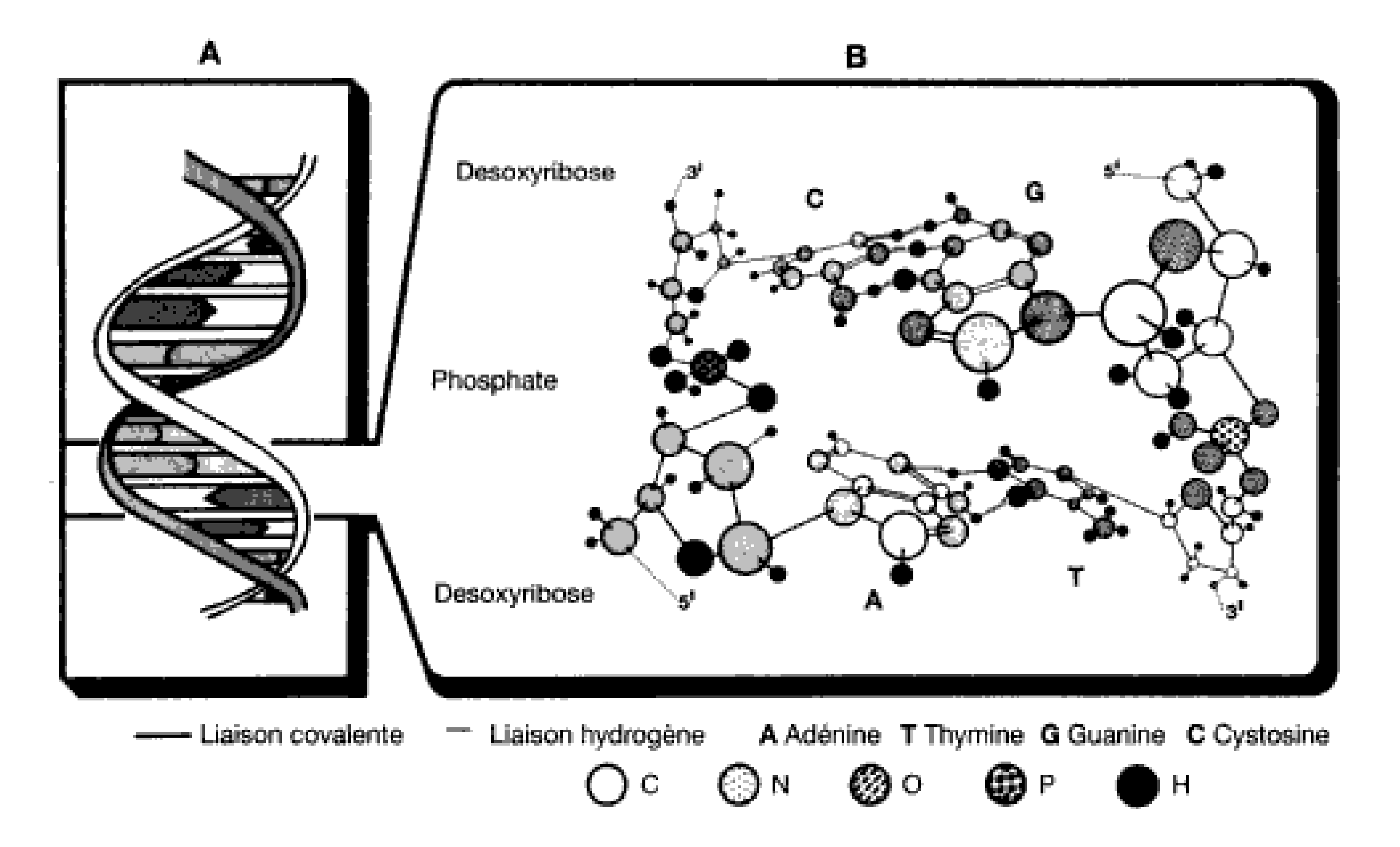


Figure II.33 – **Structure de l'ADN.**

A : structure de la double hélice ;

B : détail des polarités opposées des chaînes et des liaisons inter-bases AT et GC.

sont localisés sur un seul groupe génétique de liaison, c'est-à-dire sur le chromosome, qui n'aurait ni commencement ni fin. Le chromosome de la bactérie, support des gènes, serait donc circulaire. Ces conclusions paraissent confirmées par deux observations faites au microscope électronique sur les ADN bactériens « préparés ». Cet ADN de structure fibrillaire, extrêmement tenu et enchevêtré, est extrait des cellules avec le maximum de précautions. Cet écheveau est ensuite démêlé par un procédé doux puis déposé sur un support permettant de le photographier *(fig. II.34)*.

Le chromosome bactérien est constitué d'un filament **unique**, **continu** et **circulaire**, formé d'une double chaîne d'ADN. Sa masse molaire est de l'ordre de 3.10^9 daltons et le nombre de paires de bases de 5.10^6 environ échelonnées le long de la double hélice. À l'image de l'ADN des cellules eucaryotes, qui est couplé à des protéines basiques telles que les histones, il est possible que l'ADN des bactéries soit neutralisé non pas par des histones qui n'ont jamais été isolées chez les bactéries mais par des polyamines telles que la spermine et la spermidine. La molécule d'ADN d'*E. coli* est donc de très grande taille : elle atteint, lorsqu'elle est déroulée, 1 360 µm, soit 1,3 mm. Elle est donc associée à de petites protéines basiques analogues aux histones des eucaryotes.

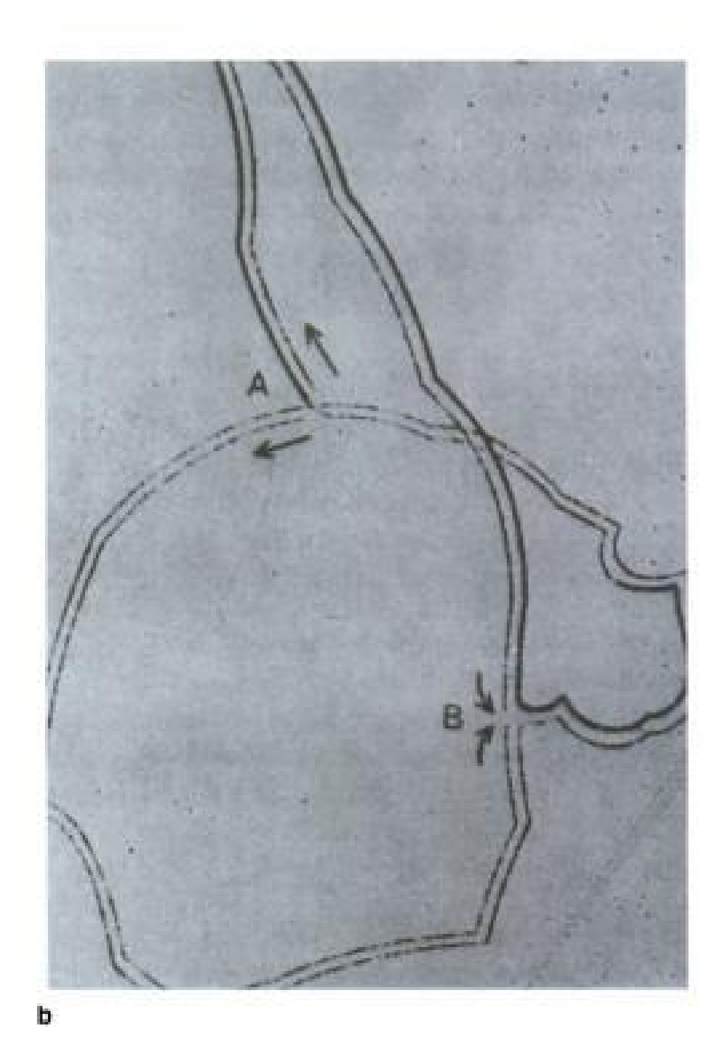
L'une d'elles, appelée protéine II, est un dimère de 2 chaînes de 9 500 daltons, où des résidus d'arginine particulièrement nombreux assurent probablement des liaisons avec les résidus phosphates de l'ADN *(fig. II.35)*. L'ADN se trouve ainsi vers « l'extérieur », le cœur étant occupé par ces protéines. Ceci donne à l'ADN un aspect type « nucléosomique » tel qu'on le rencontre chez les eucaryotes.

L'ADN isolé sous forme native présente une structure circulaire torsadée appelée super-hélice ou forme **superenroulée** *(fig. II.36)*. Elle se distingue de l'autre forme dite **relaxée** par une structure plus compacte et présente donc un comportement différent lors d'une ultracentrifugation (sédimentation plus rapide) ou lors d'une électrophorèse en gel d'agarose (migration plus rapide). Des enzymes présentes dans la cellule, les topo-isomérases, sont capables de convertir une forme en l'autre. La topo-isomérase II, appelée aussi gyrase, permet le passage de la forme superenrou-

Copyrighted material



a



b

Figure II.34 – **Autoradiographie du chromosome d'*Escherichia coli* Hfr-K_2 marqué à la thymidine tritiée.**

a : autoradiographie au cours de la replication ;

b : schéma interprétatif ; trait pointillé : double chaîne marquée ; trait plein : une seule chaîne marquée ; A : point de départ de la replication ; B : poursuite de la replication *(reproduit avec l'aimable autorisation de J. Cairns)*.

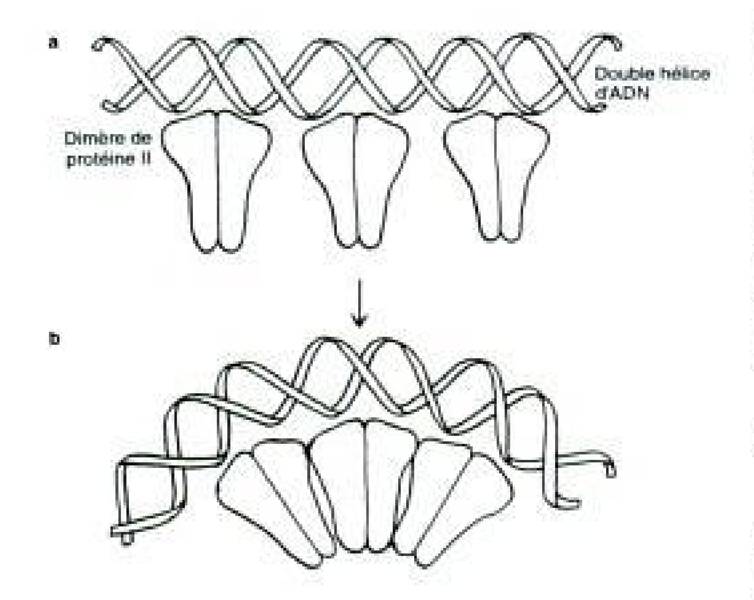


Figure II.35 – **Structure du chromosome bactérien.**

a : liaison protéine II – double hélice ;

b : formation type « nucléosomique » par liaison inter-protéine II et « courbure » de l'ADN.

lée à la forme relaxée. La topo-isomérase I réalise le passage inverse.

Des observations récentes font apparaître, là aussi, une diversité plus importante au niveau de cette structure, chromosome linéaire, chromosome non unique etc. Certaines bactéries (comme *Borrelia burgdorferi*) possèdent en effet un chromosome linéaire dont les extrémités comprennent des séquences inverses répétées, à l'instar de certains virus. Le mécanisme de réplication est inconnu mais diffère de celui des chromosomes des cellules eucaryotes.

2.5.5. Rôle de l'ADN

En 1941, Avery, à l'Institut Rockfeller, entreprend une série d'expériences destinées à mieux comprendre un phénomène décrit quelques années auparavant, en 1928, par Griffith (voir chap. VI). Un lot de souris reçoit un mélange de deux types de pneumocoques : le type R acapsulé, non virulent mais vivant, le type S capsulé et

Copyrighted material

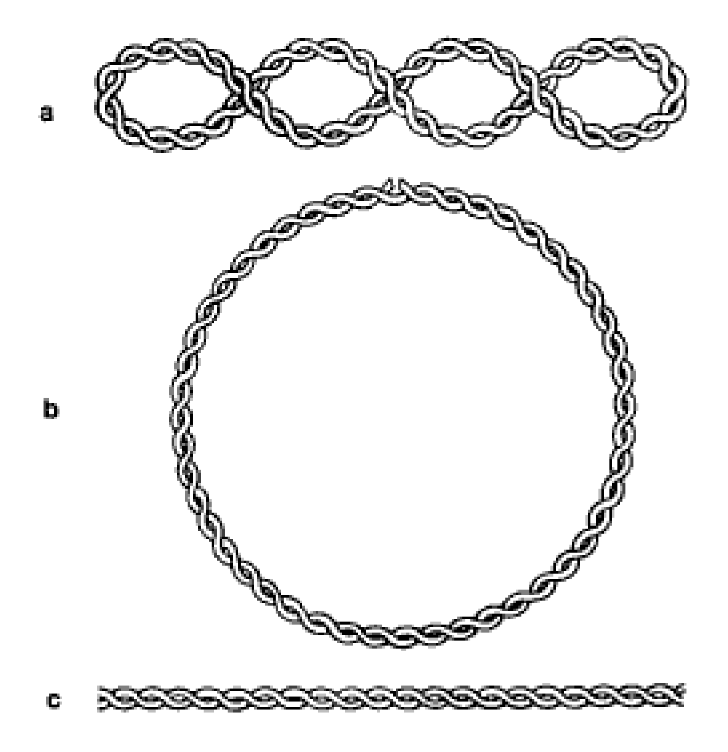


Figure II.36 – **Les trois formes de l'ADN.**

a : forme native ; double hélice circulaire superenroulée ;
b : forme partiellement dénaturée : double hélice circulaire relaxée ;
c : forme dénaturée : double hélice linéaire.

pathogène mais tué par la chaleur. La première suspension est incapable de tuer la souris ; la seconde en est également incapable puisque les bactéries sont mortes. Pourtant, dans le lot, de nombreuses souris succombent et Griffith isole dans le sang et les organes de ces animaux des pneumocoques de type S, virulents. Deux seules explications pouvaient être formulées pour expliquer le phénomène : ou les pneumocoques de type S étaient « ressuscités » ou encore, hypothèse tout aussi fantastique, le type R non pathogène avait été transformé en type S virulent. Cette découverte était beaucoup trop en avance sur les connaissances de l'époque pour qu'une explication puisse être donnée. Avery et ses collaborateurs reproduisent la même expérience *in vitro*. Ils réussissent à obtenir la transformation du type R acapsulé en type S capsulé virulent. Ils isolent le « principe actif » responsable de cette prodigieuse modification et déterminent sa nature chimique. Il ne s'agit pas, comme on le supposait à l'époque, d'une protéine mais d'un acide nucléique de poids moléculaire élevé, hautement polymérisé, l'acide désoxyribonucléique, dont le sigle, ADN, est devenu le plus célèbre de la biologie moléculaire. Au cours de ces expériences, l'ADN du pneumocoque de type S tué pénètre dans la cellule vivante de type R et induit chez elle la synthèse d'une capsule, support du pouvoir pathogène. Cet ADN est donc doué de **propriétés génétiques** fondamentales puisqu'il est le vecteur des **caractères héréditaires** de la bactérie.

Le message génétique de l'ADN est transmis sous forme d'ARN messager **(transcription)** puis exprimé (**traduction**) en séquences polypeptidiques qui formeront les protéines de structure ou les enzymes.

2.5.6. Réplication

L'ADN se réplique, c'est-à-dire qu'il se reproduit lui-même. Puisque l'appariement des bases est une spécificité rigoureuse, la séquence des bases le long d'une chaîne détermine automatiquement la séquence des bases sur l'autre chaîne. On peut comparer la double hélice parentale à une corde constituée par l'enroulement de deux cordelettes ou deux brins. Chaque brin de cette corde peut servir de moule, ou **matrice**, à la synthèse d'un nouveau brin identique à l'autre brin parental. On aboutit au schéma de la *figure II.37* dans lequel la double hélice parentale se sépare par coupure des liaisons hydrogène. En face d'une thymine viendra s'apparier un nucléotide adénine et réciproquement ; en face d'une cytosine se présentera un nucléotide à guanine et réciproquement, conformément à l'appariement A-T et G-C. Finalement, les nouveaux nucléotides appariés se polymérisent. Une nouvelle chaîne commence à se former le long d'une ancienne, suivant le processus en quatre phases qui vient d'être décrit. Une double chaîne est synthétisée, identique à la double hélice parentale, ce qui donne finalement naissance à deux hélices.

2.5.6.1. *Mode semi-conservatif*

Pour étudier le problème de la réplication, une solution simple consiste à incorporer des molécules marquées dans l'ADN des bactéries lorsqu'elles se multiplient et à suivre leur distribution dans la descendance lorsque la culture est transférée dans un milieu non marqué.

Copyrighted material

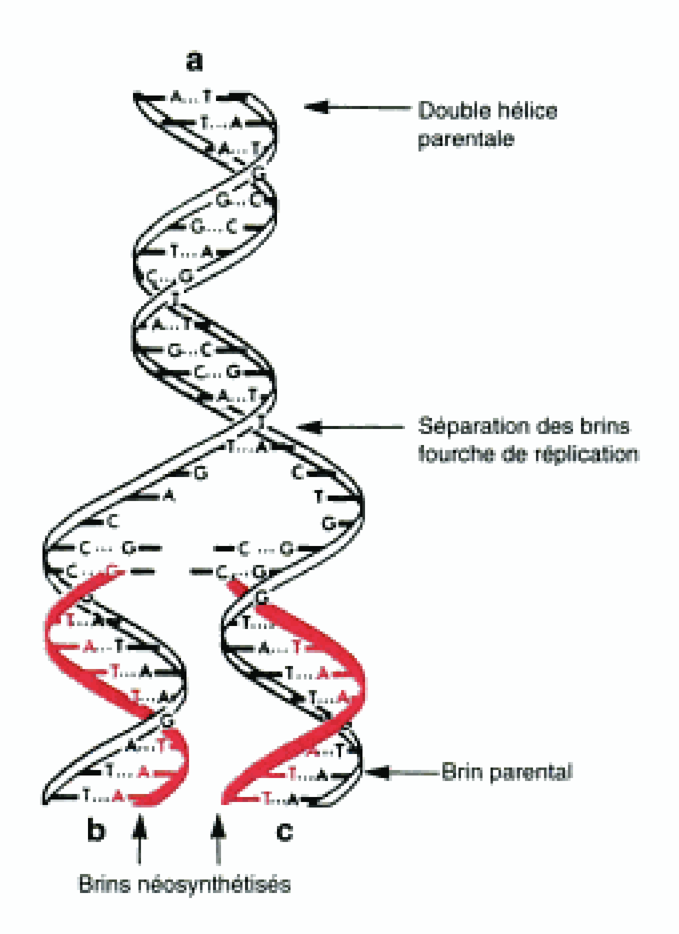


Figure II.37 – **Réplication de l'ADN.**

Les deux brins de la double chaîne parentale se séparent. Chacun sert de modèle (matrice) pour la synthèse des nouveaux brins. Synthèse par complémentarité (C pour G, G pour C, A pour T et T pour A).

Meselson et Stahl utilisent la centrifugation de l'ADN en gradient de densité pour séparer les molécules marquées et non marquées. Lorsque l'on introduit de l'ADN purifié dans une solution aqueuse de chlorure de césium 6 $M.L^{-1}$ et que l'on centrifuge à très grande vitesse (plus de 100 000 g), la solution de chlorure de césium forme un gradient de densité, c'est-à-dire une succession de concentrations ioniques de plus en plus fortes, de la surface à la base de la cellule de centrifugation. Les molécules d'ADN viennent se placer dans la zone de densité correspondant rigoureusement à la leur. Ce phénomène est utilisé pour distinguer dans la descendance l'ADN ancien de l'ADN nouvellement synthétisé.

Des *E. coli* sont cultivés pendant plusieurs générations dans un milieu contenant de l'azote « lourd » (^{15}N) (non radioactif) comme seule source d'azote jusqu'à ce que tout l'ADN ait incorporé le ^{15}N. Les cellules sont ensuite transférées dans un nouveau milieu de culture contenant de l'azote « léger » (^{14}N). La centrifugation analytique peut inventorier les différents types d'ADN au cours de la croissance. La première génération fait apparaître une nouvelle bande unique intermédiaire entre celle de l'ADN ^{15}N et l'ADN ^{14}N. Dans les générations suivantes, la bande caractéristique d'ADN ^{14}N réapparaît et la bande hybride diminue constamment en importance *(fig. II.38)*.

Ces résultats permettent de retenir un mode de réplication appelé **semi-conservatif**. En première génération, toutes les bactéries ont un ADN hybride ^{15}N-^{14}N de densité intermédiaire, c'est-à-dire formé pour moitié d'une chaîne lourde et pour moitié d'une chaîne légère. Dès la deuxième génération, apparaissent des bactéries ayant un ADN ^{14}N de faible densité qui va augmenter quantitativement, ce qui indique que la chaîne lourde servant de modèle donnera naissance à une molécule hybride tandis que l'autre, légère, donnera une molécule complètement légère. Ceci définit le schéma dit semi-conservatif *(fig. II.39)* : chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne pour qui elle sert de matrice.

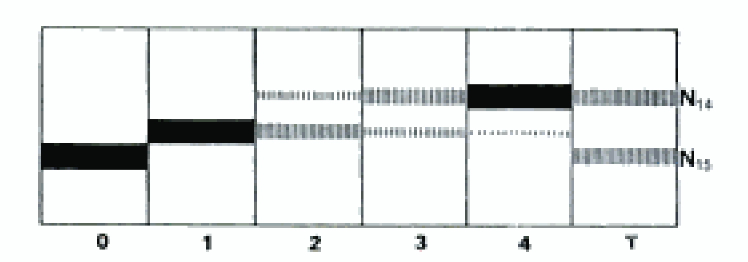


Figure II.38 – **Expérience de Meselson et Stahl.**

Chaque rectangle représente la cellule de centrifugation où l'ADN se place d'autant plus bas qu'il est plus lourd.

L'ADN est extrait d'*E. coli* ayant incorporé de l'azote lourd (^{15}N), puis des mêmes *E. coli* cultivés sur un milieu contenant de l'azote léger (^{14}N).

0 : au temps 0, l'ADN ne contient que de l'azote (^{15}N) ;

1 : à la première génération, une bande hybride apparaît, de densité intermédiaire ;

2 : à la deuxième génération, la bande hybride subsiste mais en moindre importance tandis qu'une nouvelle bande ayant incorporé à l'^{14}N se localise dans les couches moins denses ;

3 : à la troisième et à la quatrième génération, le phénomène constaté en 2 se concrétise davantage ;

T : témoin ; noter la position des deux bandes des ADN témoins à l'^{15}N et à l'^{14}N.

Copyrighted material

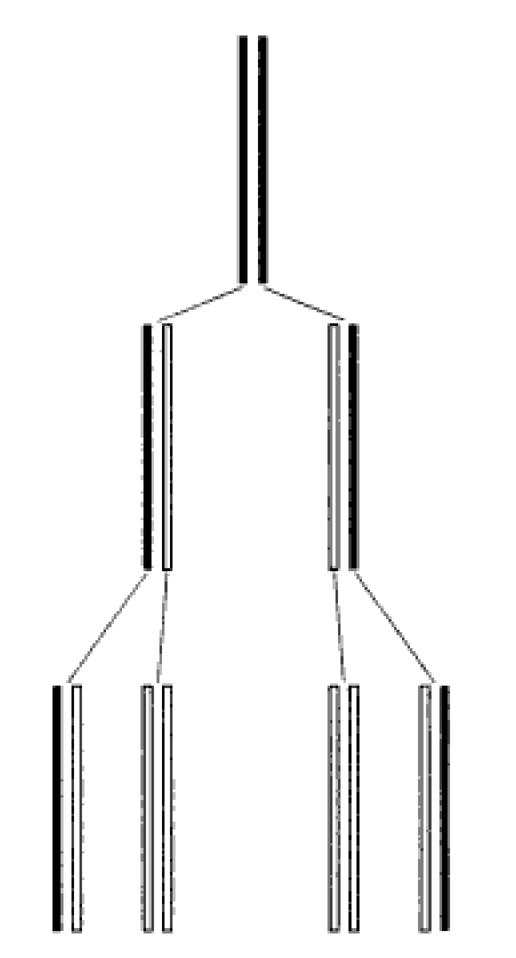


Figure II.39 – **Mode de réplication (mode semi-conservatif).**

2.5.6.2. Schéma bidirectionnel

C'est un avantage particulier de l'autoradiographie de renseigner à la fois sur la structure du corps examiné mais aussi sur l'historique de cette structure. Cairns l'a appliquée à l'étude de cellules d'*E. coli* auxquelles il avait incorporé de la thymidine tritiée pour révéler le schéma de leur duplication : seul l'ADN le plus récemment synthétisé est visible et il doit être alors possible de dire si les molécules filles sont engendrées à partir du même point ou en différentes régions de la molécule parentale. Selon Cairns, les images obtenues après marquage bref (3 minutes) montrent clairement que les deux structures marquées sont synthétisées à partir du même point. Lorsque le marquage est effectué durant plusieurs générations, les autoradiographies interprétées selon le schéma de la *figure II.34* semblent montrer que la molécule est dupliquée à partir d'un seul point qui se déplace sur toute la longueur de la double chaîne. La croissance du brin nouvellement synthétisé engendre une **fourche de réplication**.

Inspiré par le modèle de la fermeture éclair de Watson et Crick, Cairns suppose que la molécule d'ADN se réplique dans une seule direction conformément au schéma **unidirectionnel** de la *figure II.37*. S'il est facile d'imaginer la coupure des liaisons hydrogène (faibles), il est en revanche beaucoup plus embarrassant d'envisager le déroulement des chaînes parentales intimement liées d'une extrémité à l'autre. Cairns suppose l'existence d'un mécanisme assurant le déroulement de la double chaîne parentale à une extrémité qui est ainsi mobile et la synthèse des nouvelles chaînes à l'autre extrémité qui reste fixe. En se reportant au schéma de la *figure II.37*, seule l'extrémité *a* serait animée d'un mouvement de rotation, tandis que les deux pôles *b* et *c* seraient fixes.

En fait, les autoradiographies de Cairns laissent place à deux interprétations possibles *(fig. II.40)*. Certaines études expérimentales portant sur *E. coli* et *B. subtilis* remettent en cause l'hypothèse unidirectionnelle. Elles consistent à cultiver les bactéries en présence de thymidine tritiée à faible activité spécifique puis à les transférer, à des temps variables, dans un second milieu contenant le même métabolite marqué d'activité spécifique

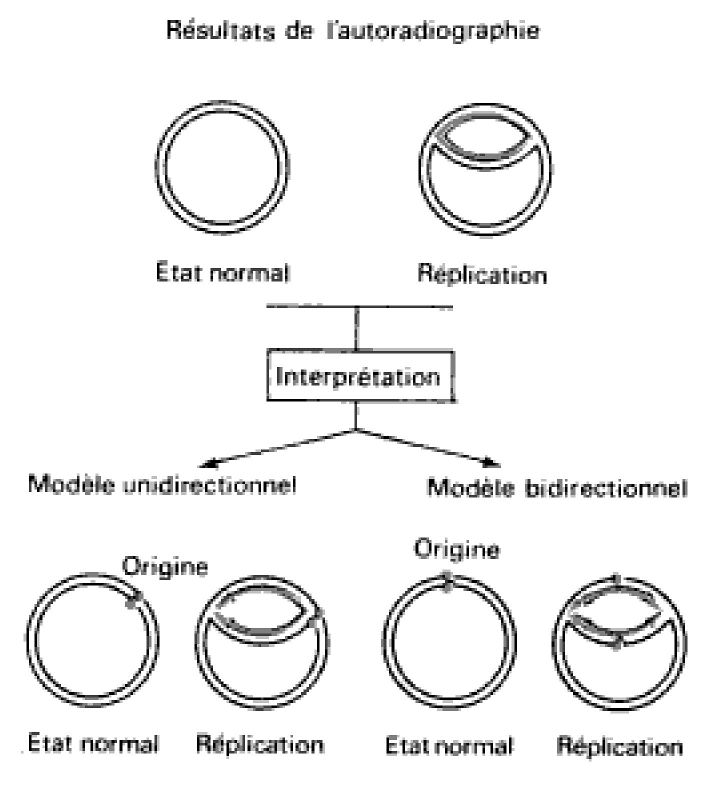
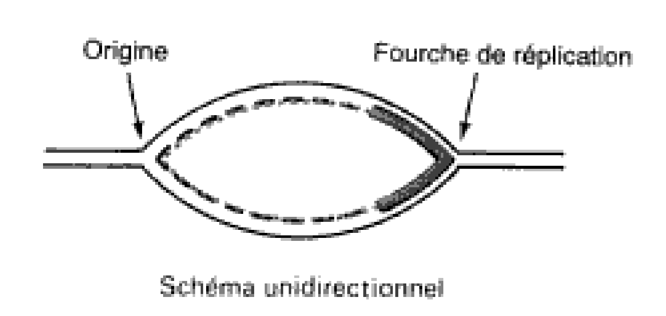


Figure II.40 – **Les deux hypothèses possibles de la réplication, à partir des résultats de l'autoradiographie.**

Copyrighted material

plus élevée. Les intensités différentes de marquage doivent permettre de repérer les régions de croissance. Si la molécule d'ADN se duplique à partir d'un seul point (schéma unidirectionnel), on observera un marquage intensif dans une seule des fourches de la bulle (ou « œil ») de réplication. Les expériences révèlent au contraire que la forte radioactivité est localisée aux deux fourches de réplication *(fig. II.41)*. Ainsi, la réplication s'effectuerait selon un schéma **bidirectionnel**. Les deux chaînes d'ADN parentales se répliquent simultanément jusqu'à ce que les deux points de croissance se rencontrent.



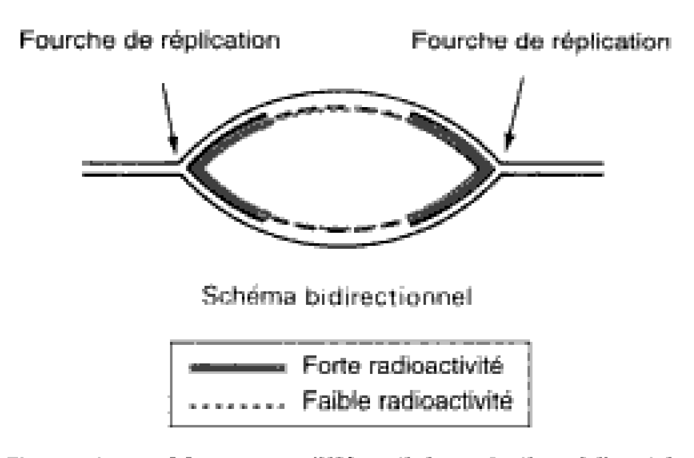


Figure II.41 – **Marquage différentiel par la thymidine tritiée de l'ADN en duplication de *E. coli* montrant les deux types de résultats selon l'hypothèse unidirectionnelle ou bidirectionnelle de la réplication.**

2.5.6.3. *Mécanisme moléculaire*

L'étude des mécanismes enzymatiques complexes intervenant dans la réplication de l'ADN a considérablement progressé depuis les travaux amorcés par Kornberg et Hurwitz en 1956 et qui avaient trait à une enzyme appelée actuellement ADN polymérase I. De nombreuses autres enzymes impliquées ont en effet été isolées.

2.5.6.3.1. *ADN polymérases*

Trois types d'ADN polymérases (I, II et III) ont été isolés chez *E. coli* ; des protéines aux propriétés analogues ont été retrouvées chez d'autres micro-organismes et aussi dans les cellules animales. Ces enzymes catalysent l'addition de désoxyribonucléotides à l'extrémité d'une chaîne d'ADN ; elles sont aussi porteuses d'une activité exonucléasique.

• **ADN polymérase I**. Son rôle dans la réplication de l'ADN n'est plus considéré comme essentiel ; elle agirait davantage au niveau de la réparation. D'une masse molaire de 109 kd, elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 1 000 acides aminés. La polymérase I catalyse l'addition des désoxyribonucléotides à l'extrémité d'une chaîne d'ADN. Cette réaction ne se produit qu'en présence d'ADN préformé. L'addition de l'unité mononucléotidique s'effectue à l'extrémité 3' libre ; la synthèse a donc lieu dans le sens 5' → 3'. Elle possède également une activité exonucléasique dans les sens 5' → 3' et 3' → 5'.

• **ADN polymérase II**. Elle a été hautement purifiée. Sa masse molaire est d'environ 120 kd. Son activité propre est double. Elle possède une activité exonucléasique 3' → 5' mais non 5' → 3' ; elle nécessite, pour son activité polymérasique, une structure nucléotidique « amorce ». La fonction biologique de la polymérase II dans la cellule n'est pas connue.

• **ADN polymérase III**. Découverte en 1972, elle est de loin la plus active des trois polymérases : 15 fois plus que la polymérase II. Sa forme active est un assemblage, ou holoenzyme, de 7 polypeptides différents. Elle possède l'activité exonucléasique 5' → 3' et l'activité polymérasique.

2.5.6.3.2. *ADN ligase*

L'ADN ligase unit les extrémités de deux chaînes d'ADN en catalysant la synthèse d'un pont phosphodiester entre un hydroxyle 3' de l'extrémité d'une chaîne et le phosphate 5' de l'extrémité de l'autre chaîne. La réaction, qui nécessite de l'énergie, est couplée à l'hydrolyse de la liaison pyrophosphorique de NAD. L'ADN ligase peut seulement former un pont phosphodiester entre les extrémités des chaînes, mais elle ne peut répliquer aucun segment de matrice.

L'ADN ligase d'*E. coli* a été hautement purifiée ; elle est formée d'une chaîne peptidique unique d'une masse molaire de 77 kd ; chaque cellule en contient de 200 à 400 copies. Elle possède quatre fonctions essentielles :

– elle répare les coupures survenant sur l'une des chaînes de l'ADN bicaténaire ;

– elle assure la fermeture et la circularisation des molécules linéaires d'ADN bicaténaire, ce qui nécessite des extrémités monocaténaires complémentaires ;

– elle effectue les soudures des fragments d'ADN au cours des recombinaisons génétiques ;

Copyrighted material

– elle intervient dans la réplication de l'ADN en coopération avec les ADN polymérases.

2.5.6.3.3. Hélicase

Les chaînes de l'ADN chromosomique bicaténaire doivent être séparées pour permettre la réplication. Ce rôle est dévolu à des protéines appelées hélicases, mises en évidence dans des cellules bactériennes infectées par des virus. Elles ont des masses molaires variables, comprises entre 10 et 75 kd. Elles utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP.

2.5.6.3.4. Gyrase

Le chromosome d'*E. coli* mesure environ 1 360 µm, ce qui correspond approximativement à 4.10^6 paires de nucléotides, soit 4.10^5 tours de spires. La déspiralisation de cette énorme molécule, qui se réplique en 30 minutes, devrait s'effectuer théoriquement à une vitesse supérieure à 10 000 tours/min.

La découverte d'une enzyme nouvelle, la gyrase, a permis de formuler une explication plus plausible à ce phénomène. La gyrase provoque une coupure au niveau de l'un des brins ; celle-ci a pour effet la déspiralisation de la molécule superenroulée qui revient à l'état de molécule circulaire enroulée. Il s'agit en fait d'une topo-isomérase de type II. La réplication de l'ADN peut alors se poursuivre. L'ATP interviendrait au niveau de la fixation et de la libération de l'enzyme.

L'acide nalidixique et la novobiocine, antibiotiques bloquant la synthèse de l'ADN, sont des inhibiteurs de la gyrase.

2.5.6.3.5. Mécanisme enzymatique (fig. II.42)

La réplication du chromosome bactérien débute en un point spécifique qu'on appelle le point origine ou le **point d'initiation**, probablement lié à la membrane. Précédant l'action des enzymes de la réplication, plusieurs hélicases et gyrases s'attachent à l'un des brins du chromosome et l'ouvrent en formant une boucle dans la superhélice, ce qui rend l'un ou les deux brins accessibles *(fig. II.42b et c)*.

Au niveau de la fourche de réplication, l'un des deux brins peut être synthétisé dans le sens de

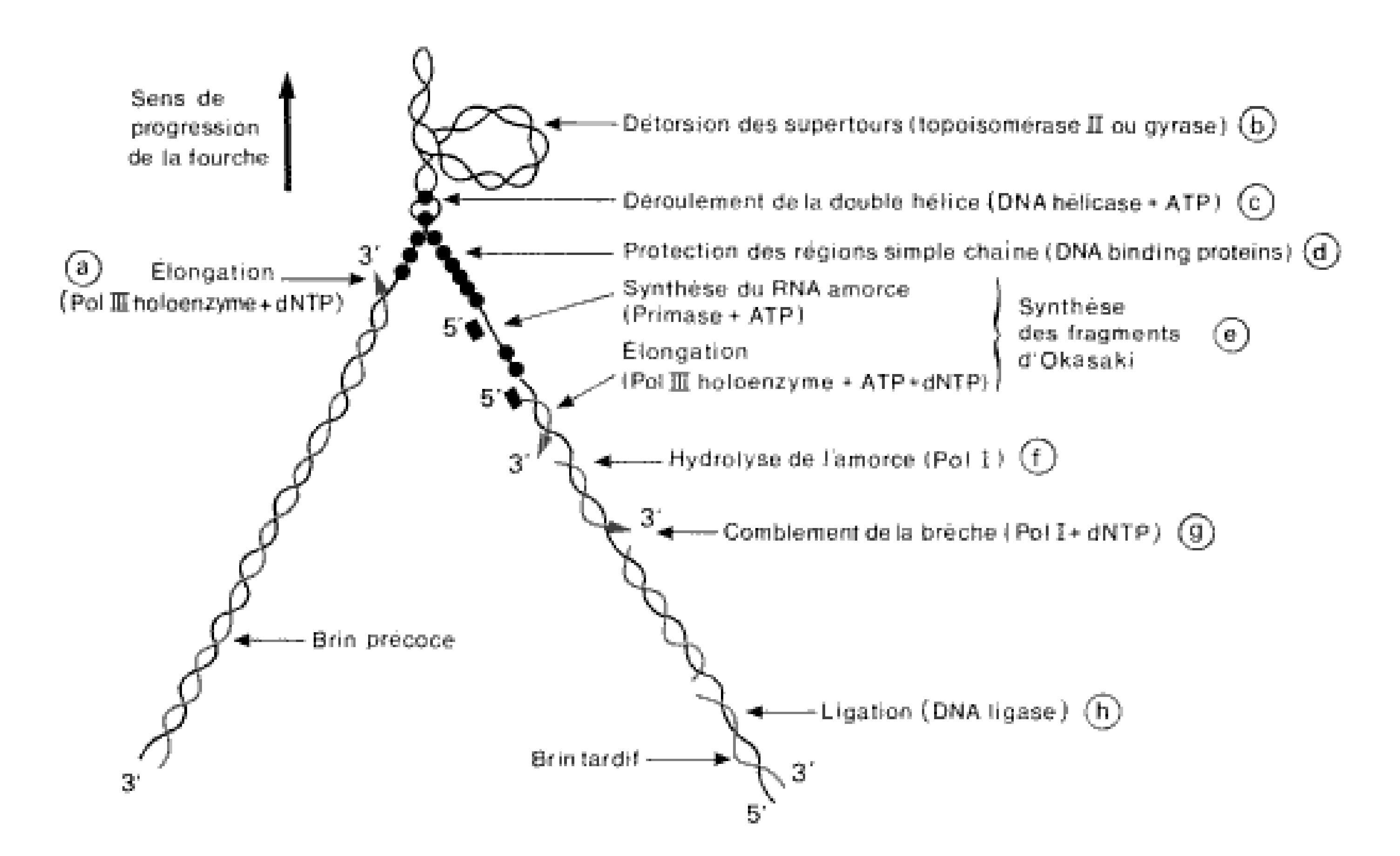


Figure II.42 – **Fourche de réplication de l'ADN chez *E. coli*.**

Copyrighted material

déplacement de la fourche (c'est-à-dire celui 3' OH libre), l'ADN polymérase III catalysant la synthèse du brin néoformé *(fig. II.42a)* ; il est appelé brin **précoce**. L'autre (à extrémité 5' OH libre) sera synthétisé par fragments, dits **fragments d'Ogasaki** *(fig. II.42e)*, et est appelé brin **tardif**. Ces fragments, de 1 000 à 2 000 résidus, nécessitent une amorce d'ARN *(fig. II.42e)* synthétisée par une ARN polymérase-ADN dépendante ou primase (en fait, un complexe polypeptidique appelé **primosome**). Cette amorce d'ARN sera ensuite excisée grâce à l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase I *(fig. II.42f)*. Les délétions issues de cette excision sont remplacées par de l'ADN néoformé sous l'action de l'ADN polymérase I *(fig. II.42g)*. Enfin, l'ADN ligase relie les différentes séquences au niveau de leurs extrémités 3' OH et 5' OH libres *(fig. II.42h)*.

Pendant toutes ces opérations, les brins d'ADN matrice doivent être impérativement maintenus, déroulés et stabilisés. Cette fonction est dévolue à des protéines appelées ADN *binding proteins* : elles maintiennent les brins sous forme étendue, déplissée et rigide permettant l'action des divers systèmes enzymatiques *(fig. II.42d)*.

2.5.6.4. Modèle de Jacob et Brenner

La vitesse de progression de la fourche de réplication est constante dans des conditions expérimentales assez larges. Avec *E. coli* par exemple, pour un temps de génération de 40 minutes à 37 °C, le temps requis pour le doublement de la molécule d'ADN est de 40 minutes. Si, en revanche, des conditions plus favorables permettent un temps de génération plus court, par exemple de 20 minutes, de nouvelles fourches de réplication sont formées avant que le premier cycle de duplication ne soit achevé. Il est facile d'en déduire que le démarrage du cycle de réplication est soumis à un contrôle. Cette initiation nécessite, en effet, la synthèse d'une protéine spécifique, l'**initiateur**. Le site d'initiation de la synthèse, c'est-à-dire le point où commence la séparation de la double chaîne d'ADN (fourche), est appelé le **réplicateur**. Selon le modèle de Jacob et Brenner, le site réplicateur et le gène commandant la synthèse de l'initiateur formeraient une unité autonome de réplication appelée **réplicon**.

C'est au niveau du site réplicateur que se fixerait l'ADN polymérase pour progresser tout au long de la chaîne. Ce site serait situé au niveau de la membrane :

– au début du cycle de réplication *(fig. II.43a)*, le duplex est relié à la membrane cytoplasmique au niveau du site réplicateur. Le système enzymatique est également localisé au point d'attachement chromosome-membrane. L'un des brins est fermé mais peut se dérouler à partir du site réplicateur qui sert de pivot. L'autre est coupé, libérant à une extrémité un 5' phosphate et à l'autre un hydroxyle 3' ;

– l'une des extrémités libres (5' P) se fixe à un nouveau site d'attachement voisin du précédent *(fig. II.43b)* ;

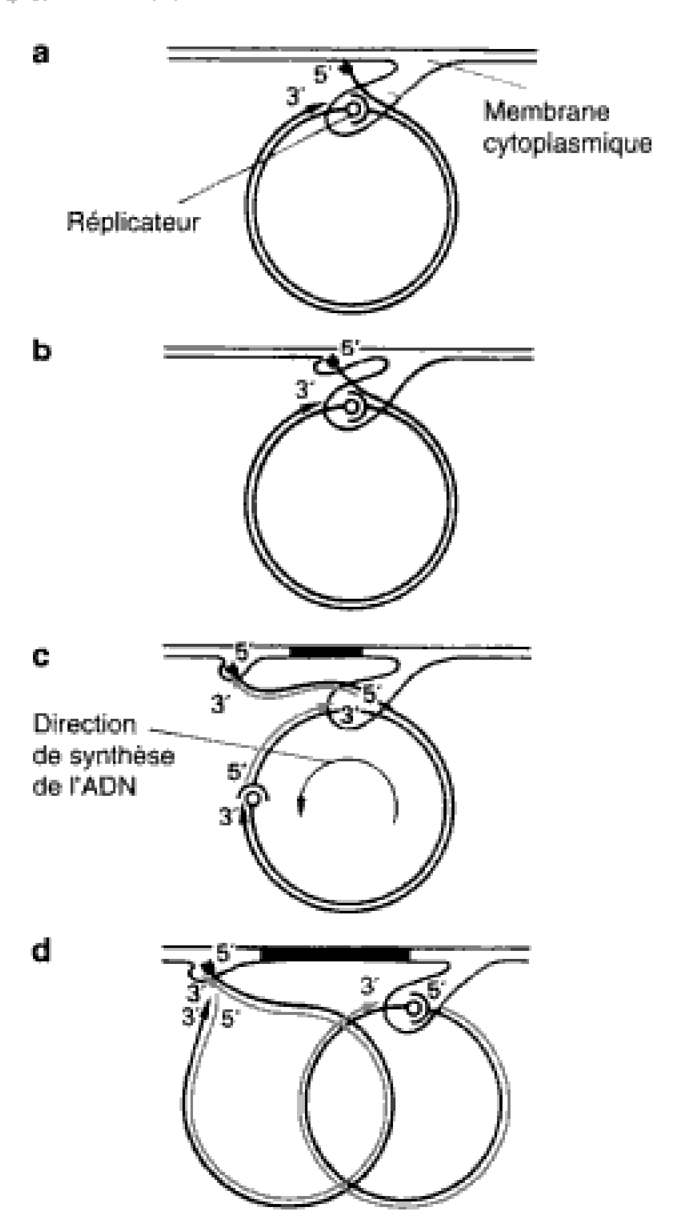


Figure II.43 – **Modèle de réplication.**
(Selon Jacob et Brenner).

Copyrighted material

– au niveau de la fourche de réplication ainsi constituée, la synthèse des deux nouvelles chaînes s'effectue selon le mécanisme enzymatique déjà défini, l'ADN polymérase restant fixée au niveau de la membrane tandis que le duplex parental se déplace. Cet entraînement du duplex est provoqué par la synthèse de la membrane cellulaire dans la région qui sépare les deux sites d'attachement, ancien et nouveau *(fig. II.43c)* ;

– la croissance de la membrane se poursuit jusqu'au déroulement complet du duplex parental et, par voie de conséquence, jusqu'à la formation des deux duplex fils. Les deux chromosomes fils sont alors complètement séparés l'un de l'autre tandis que d'autres synthèses se sont poursuivies dans la bactérie qui s'est progressivement allongée. L'un de ces chromosomes est totalement ouvert : les extrémités libres de l'un des brins doivent alors se souder pour reproduire le cercle fermé initial*(fig. II.43d)*.

2.6. Plasmides

La cellule bactérienne peut contenir des éléments génétiques extrachromosomiques, capables d'autoreproduction, que Lederberg, en 1952, propose d'appeler des **plasmides** pour marquer leur caractère indépendant par rapport aux gènes portés par le chromosome. Cette définition, à l'époque, s'appliquait essentiellement aux facteurs sexuels F que Lederberg avait découverts quelques années auparavant (voir chap. VI).

Ce n'est qu'en 1959 que l'on comprit la véritable nature de ces éléments et que l'on en pressentit toute l'importance. C'est en effet à cette époque qu'au Japon, des recherches effectuées sur des malades atteints de dysenterie bactérienne insensible à tout traitement antibiotique aboutissent à une importante découverte. Les bactéries responsables, *Sh. dysenteriae*, portent des gènes qui les rendent résistantes à plusieurs antibiotiques simultanément. De plus, ces gènes peuvent assurer leur propre transfert à d'autres bactéries intestinales par **conjugaison**, comme le facteur F (voir chap. VI). La découverte de ces facteurs de résistance (appelés facteurs R) devait avoir un retentissement considérable à la fois par sa portée clinique et sa signification biologique. Peu de temps après, des facteurs identiques sont mis en évidence chez les *Staphylococcus*. Les gènes responsables codent pour la synthèse d'une pénicillinase qui dégrade la pénicilline et rend les bactéries résistantes. Mais à l'inverse des éléments précédents, ils sont transférés par l'intermédiaire d'un bactériophage, c'est-à-dire par **transduction** (voir chap. VI).

En tout état de cause, ces facteurs sont différents des facteurs F car ils ne s'incorporent pas dans leur intégralité au chromosome ; aussi n'entrent-ils pas dans la définition de l'épisome. Le terme plus général de plasmides, proposé initialement par Lederberg, a été, de ce fait, remis en usage à l'initiative de Novick (1963) *(tab. II.4)*.

Certains plasmides (facteurs F) peuvent s'intégrer au chromosome (épisomes) au niveau de sites spécifiques, séquences homologues complémentaires présentes à la fois sur le plasmide et sur le chromosome. Ces sites sont nommés **éléments d'insertions** (IS). Ils comportent environ 1 000 paires de bases un certain nombre ont été individualisés chez *E. coli* tel IS_1 (768 pb) et IS_2 (1 327 pb).

2.6.1. Structure

Comme toute structure porteuse d'informations génétiques, le plasmide est une molécule d'ADN. Ces molécules d'ADN plasmidique *(fig. II.44)* sont généralement de petite taille, le 1/100 environ de celle du chromosome (4,2 Md pour pColE1 présente chez *E. coli*, 25 Md pour R6K présent chez les bactéries à Gram négatif).

Leur enroulement serré (torsadé) leur assure probablement un encombrement minimal et leur confère une grande résistance (en particulier aux forces mises en jeu au cours de l'extraction). Leur masse molaire varie d'environ 0,5 Md à plus de 400 Md, c'est-à-dire qu'elle est comparable à celle de l'ADN viral.

2.6.2. Réplication

La réplication plasmidique est, comme celle du chromosome ou du facteur F, étroitement régulée au niveau de sites membranaires. Elle est sous la

Copyrighted material

Tableau II.4 – Principaux types de plasmides.

Types	Exemples	Taille approximative (kb)	Hôtes	Phénotypes
Facteur de fertilité	Facteur F	95-100	*E. coli, Salmonella, Citrobacter*	Pilus sexuel, conjugatif
Plasmides R	– RP_4 – R1 – pSH_6 – pSJ_{23a}	54 80 21 36	– *Pseudomonas* et autres Gram- – Gram – – *S. aureus* – *S. aureus*	– Pilus sexuel, conjugatif, résistance Ap,Km, Nm, Tc – Résistance à Ap, Km, Su, Cm, Sm – Résistance à Gm, Tm, Km – Résistance à Pn, Asa, Hg, Gm, Km, Nm, Em…
Plasmides Col	– col E_1 – col E_2	9	– *E. coli* – *Shigella*	– Colicine E_1 – Colicine E_2
Plasmides de virulence	– Ent (P307) – ColV-K_{30} – pZa 10	83 2 56	– *E. coli* – *E. coli* – *S. aureus*	– Production d'entérotoxine – Sidérophore pour capture du Fer, résistance aux mécanismes immunitaires – Entérotoxine B
Plasmides métaboliques	– CAM – SAL – TOL	230 56 75	– *Pseudomonas* – *Pseudomonas* – *P_1. putida*	– Dégradation du camphre – Dégradation du salicylate – Dégradation du toluène

Légende : Ap : Ampicilline ; Asa : Arséniate ; Cm : Chloramphénicol ; Em : Erythromycine ; Gm : Gentamycine ; Hg : Mercure ; Km : Kanamycine ; Mm : Néomycine ; Pn : Pénicilline . Sm : Streptomycine ; Su : Sulfamides ; Tc : Tétracycline.

dépendance d'un nombre limité de gènes. Des plasmides auxquels de longs fragments d'ADN ont été excisés demeurent en effet viables. Un mécanisme de contrôle assure à la fois la réplication, le nombre de copies et la répartition équitable des copies dans les cellules filles après la division cellulaire (perte spontanée inférieure à 1 %). L'**incompatibilité plasmidique**, c'est-à-dire l'impossibilité pour deux plasmides de nature différente (appartenant à des groupes différents) de coexister dans une même cellule, est une des conséquences de ce contrôle. Cette incompatibilité est un phénomène général observé dans tous les genres bactériens (entérobactéries, *Pseudomonas, Staphylococcus* et *Streptococcus*). On peut utiliser ce phénomène pour classer les plasmides.

2.6.3. Transfert

Le transfert d'un plasmide d'une bactérie dite **donatrice** à une bactérie dite **réceptrice** peut se faire par **conjugaison**, **mobilisation**, **transduction ou transformation**. Il peut y avoir cotransfert de plusieurs plasmides ou pas de transfert du tout ce qui, dans ce cas, ne signifie pas qu'il y ait absence de plasmide.

2.6.3.1. Transfert par conjugaison

Ce mode de transmission est caractéristique des bacilles à Gram négatif. De nombreux plasmides sont capables d'organiser leur propre transfert par conjugaison, après contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice. Ces plasmides, dits **conjugatifs**, ont une masse molaire supérieure à 30 Md (60 chez le plasmide F d'*E. coli*). Le nombre de copies par cellule est faible (de 1 à 3) et, de plus, le plasmide induit la synthèse de *pili* « sexuels » permettant l'accouplement. Il peut se réaliser entre bactéries de même espèce mais aussi entre espèces éloignées, par exemple entre entérobactéries et *Pseudomonas* ou *Vibrio*. Des phénomènes de conjugaison de ce

Copyrighted material

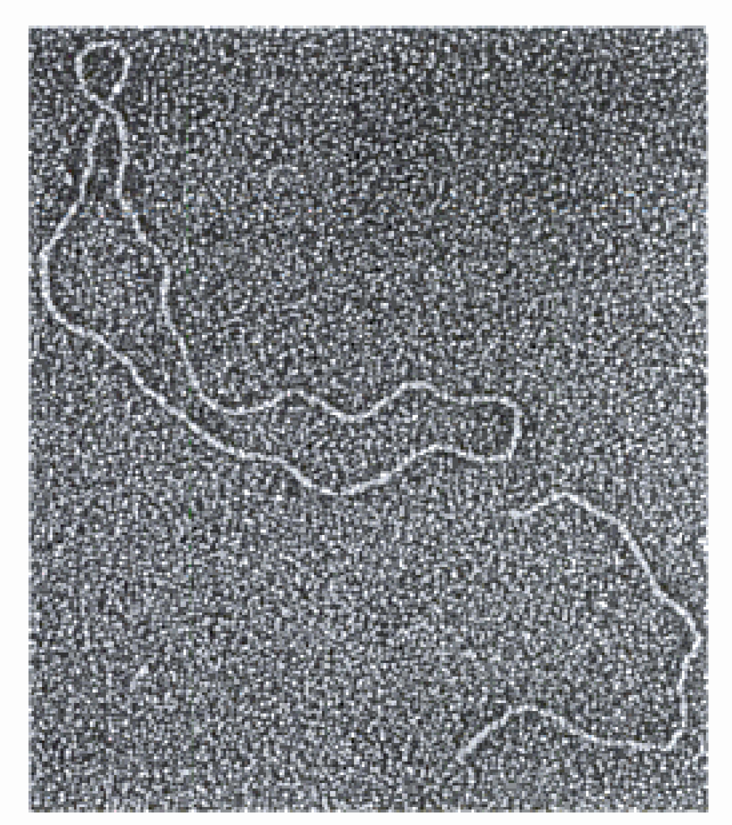


Figure II.44 – **Plasmides × 10 000.**
(Photo publiée avec l'autorisation du Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes, Photo C. Ruhlmann).

type ont été aussi décrits chez *Streptomyces, Streptococcus* et *Cl. perfringens*.

D'autres plasmides dits **non conjugatifs**, de plus petite taille (de 0,5 à 50 Md) ne sont pas autotransmissibles par conjugaison. Ils sont souvent cryptiques et ne codent pour aucune fonction décelable hormis l'autoréplication. Leur nombre de copies par cellule est cependant plus élevé (de 10 à 15 pour le plasmide $pCol_{E1}$ d'*E. coli*). Leur transfert ne peut se réaliser que par « mobilisation » par un autre plasmide présent dans la même cellule et lui-même autotransférable.

2.6.3.2. *Transfert par transduction*

Dans ce cas, le transfert s'effectue par l'intermédiaire d'un bactériophage (voir chap. VI). Il ne concerne que des bactéries « proches » phylogéniquement et sur lesquelles le bactériophage peut se fixer. C'est le mode de transfert exclusif des caractères de résistance aux antibiotiques observés chez les *Staphylococcus* et les *Streptococcus*.

2.6.3.3. *Transfert par transformation*

Conjugatifs ou non, les plasmides peuvent être introduits dans une bactérie rendue préalablement compétente (traitement au $CaCl_2$ pour *E. coli* par exemple) ; c'est le phénomène de transformation (voir chap. VI). Une fois introduit dans l'hôte bactérien, l'ADN plasmidique se réplique normalement et exprime immédiatement la batterie de déterminants génétiques (résistance aux antibiotiques, par exemple) qu'il porte.

2.6.4. Propriétés

2.6.4.1. *Résistance aux antibiotiques*

On estime que la **résistance plasmidique** intervient dans plus de 90 % des cas observés en clinique, les 10 % restants étant dus à la résistance chromosomique. La première résulte en effet d'un long processus d'évolution qui aboutit à la protection de la bactérie sans réduire sa faculté d'adaptation. Les mutants résistants sont au contraire des infirmes évolutifs, destinés à une mort rapide dans les conditions naturelles (absence d'antibiotique).

La résistance plasmidique est aussi observée de plus en plus fréquemment avec les métaux lourds. Les *Staphylococcus* initialement et les bacilles à Gram négatif plus récemment deviennent ainsi insensibles aux composés mercuriels, aux sels de cadmium, de bismuth, de plomb, d'antimoine et aux ions arséniates et arsénites.

2.6.4.2. *Production de substances à rôle pathogène*

L'un des exemples les plus remarquables et les plus étudiés est rencontré chez les *E. coli*. Les travaux de ces dernières années définissent en effet trois groupes d'*E. coli* responsables de diarrhées. D'un point de vue chronologique, ce sont :

– les *E. coli* **entéropathogènes**, aux sérotypes spécifiques, responsables chez les nourrissons de fréquentes poussées des maladies diarrhéiques apparues entre les années 1940 et 1960 ;

– les *E. coli* **entérotoxiques**, considérés comme une des causes importantes de diarrhées dans les pays en développement ainsi que chez les voyageurs traversant ces pays ;

– les *E. coli* **entéro-invasifs**, dont le pouvoir pathogène s'apparente à celui des *Shigella*.

Le pouvoir pathogène de chacune de ces catégories de germes est sous la dépendance de déter-

Copyrighted material

minants plasmidiques responsables de la synthèse d'entérotoxines (*E. coli* entérotoxique) et de certaines substances qu'on appelle des facteurs de colonisation et qui assurent l'adhérence des bactéries à l'épithélium intestinal puis son envahissement.

2.6.4.3. *Production de bactériocines*

En 1915, Gratia décrit une action antagoniste spécifique entre deux souches d'*E. coli*. Les substances responsables, rencontrées tout d'abord chez les entérobactéries puis chez la plupart des groupes bactériens à Gram positif ou négatif, sont appelées des **bactériocines**. Ce sont des protéines dont la biosynthèse est létale et dont l'absorption est conditionnée par la présence d'un récepteur spécifique. Le nom des bactériocines est toujours dérivé de l'espèce bactérienne ou du genre sur lequel elles agissent : colicines *(E. coli)*, pyocines *(Ps. pyocyanea)*, vibriocines *(V. cholerae)*, entérocines, méningocines, etc.

Les **colicines** sont de loin les mieux connues. Elles s'apparentent aux antibiotiques par leur pouvoir bactéricide puissant, voire bactériolytique, mais elles s'en différencient par leur nature, essentiellement protéique, par leur mode d'action au niveau des circuits régulateurs de la cellule et, surtout, par leur transmission héréditaire.

2.6.4.4. *Caractères métaboliques*

Un grand nombre de caractères biochimiques des bactéries sont d'origine plasmidique. Ils ont été particulièrement observés chez les *Enterobacteriaceae* : utilisation du citrate de sodium, production d'H_2S, hydrolyse de l'urée avec *E. coli*, dégradation du lactose dans les genres *Salmonella, Proteus, Serratia*, dégradation du saccharose avec certaines souches de *Salmonella*. Les plasmides qui codent pour ces propriétés inhabituelles chez les souches sauvages sont appelés **plasmides métaboliques**. Leur présence constitue une source d'erreur non négligeable pour l'identification des souches de micro-organismes.

D'autres fonctions physiologiques ont aussi un support plasmidique ; il s'agit notamment de la fixation de l'azote chez les *Enterobacteriaceae* et de la dégradation d'un certain nombre de produits chimiques par des bactéries du genre *Pseudomonas* (octane, camphre, naphtaline, salicylate). Chez les *Staphylococcus*, les productions de pigment, de coagulase, d'hémolysine et de fibrinolysine seraient aussi d'origine plasmidique.

2.7. Transposons

Les **transposons** sont formés d'une série de gènes encadrés par des éléments d'insertion d'une quinzaine de paires de bases à chaque extrémité. Ils peuvent donc « migrer » d'une molécule d'ADN à une autre à condition que celle-ci possède des séquences correspondantes aux éléments d'insertion (complémentaires).

Ces gènes codent notamment pour un grand nombre de caractères de résistance aux antibiotiques. Ainsi ont été mis en évidence, chez *E. coli*, TN_3 (4 957 pb, résistance à l'ampicilline), TN_5 (5 700 pb, résistance à la kanamycine), TN_{2571} (23 000 pb, résistance au chloramphénicol, à l'acide fusidique, à la streptomycine, aux sulfamides et au mercure).

Le transposon TN_3 a été plus particulièrement étudié. Il comporte, en dehors des éléments d'insertion et du gène de résistance à l'ampicilline (gène bla codant pour une β-lactamase), une séquence codant pour une « tranposase » (responsable du phénomène de transposition) et un gène répresseur assurant la régulation du système *(fig. II.45)*.

2.8. Éléments inconstants

2.8.1. Capsule

De nombreuses bactéries élaborent des substances organiques visqueuses qui entourent leur paroi d'une couche plus ou moins compacte. Lorsque cette **couche gélatino-muqueuse** présente une surface externe libre et nettement définie, on a l'habitude, avec Tomcsik, de l'appeler capsule. En revanche, lorsque ces structures sont plus diffuses et abondamment sécrétées, on leur donne généralement le nom de **couches visqueuses**.

Toutes les bactéries ne produisent pas de capsule et, dans une même souche, sa formation est largement influencée par les constituants du milieu ; les glucides jouent à cet égard un rôle important.

2.8.1.1. *Mise en évidence*

Pour mettre en évidence la capsule chez la bactérie, on procède habituellement à la coloration à l'encre de Chine : sur le fond noir de la préparation constituée par un mélange d'encre de Chine et de suspension microbienne, la capsule apparaît

Copyrighted material

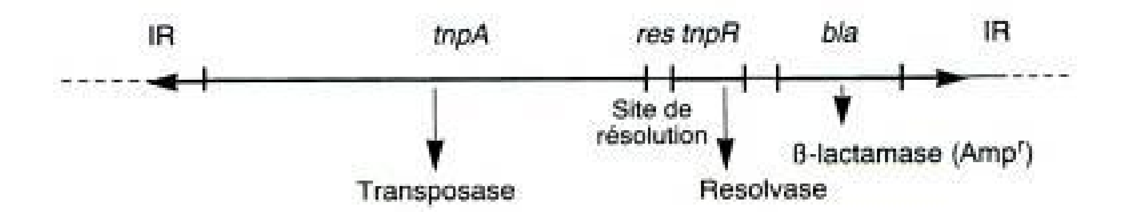


Figure II.45 – **Transposon Tn3 : gènes tpnA (transposase), bla (β-lactamase) et tnpR (résolvase).**
Séquences IR : éléments d'insertion présentant des séquences terminales identiques et inversées (inverted repeats).

comme un halo brillant, réfringent, entourant le corps bactérien ; les particules de l'encre, agitées de mouvements browniens, viennent se heurter contre lui.

Un deuxième type de technique, mieux connu sous le nom de réaction de gonflement de la capsule ou réaction de Neufeld, est fondé sur une combinaison antigène-anticorps : lorsque des bactéries capsulées sont mises au contact d'un immunsérum spécifique, on observe au microscope à contraste de phase un « gonflement » de la capsule. C'est en réalité une précipitation des anticorps qui réagissent avec les antigènes capsulaires correspondants. La rigoureuse spécificité de cette réaction a un grand intérêt immunologique : elle permet l'étude des constituants capsulaires d'une espèce et peut être à la base d'une classification antigénique au sein de cette espèce (immunotype ou sérotype).

2.8.1.2. Morphologie et composition chimique

Généralement, la capsule entoure une cellule bactérienne ou, parfois, une courte chaînette de quelques éléments. Sa présence et surtout son importance donnent aux colonies obtenues en milieu solide un aspect muqueux caractéristique, les colonies de type M (par exemple, *K. pneumoniae*). Sans doute peut-on rapprocher de ces aspects ce que l'on observe chez les bactéries filamenteuses, les *Sphaerotilus* (*fig. II.46*) : ce sont ici de véritables gaines très longues dans lesquelles les cellules forment des chaînes continues. Il en est de même de ces amas visqueux entourant et noyant dans leur masse de très nombreuses cellules et que l'on appelle **zooglées**.

La nature des constituants capsulaires est fréquemment **polyholosidique**, quelquefois **polypeptidique**. Chez le pneumocoque, plus étudié en raison de son pouvoir pathogène, il s'agit de polyholosides formés de longues chaînes d'acides polyaldobioniques. Un acide aldobionique, comme le montre la *figure II.47*, est composé d'un

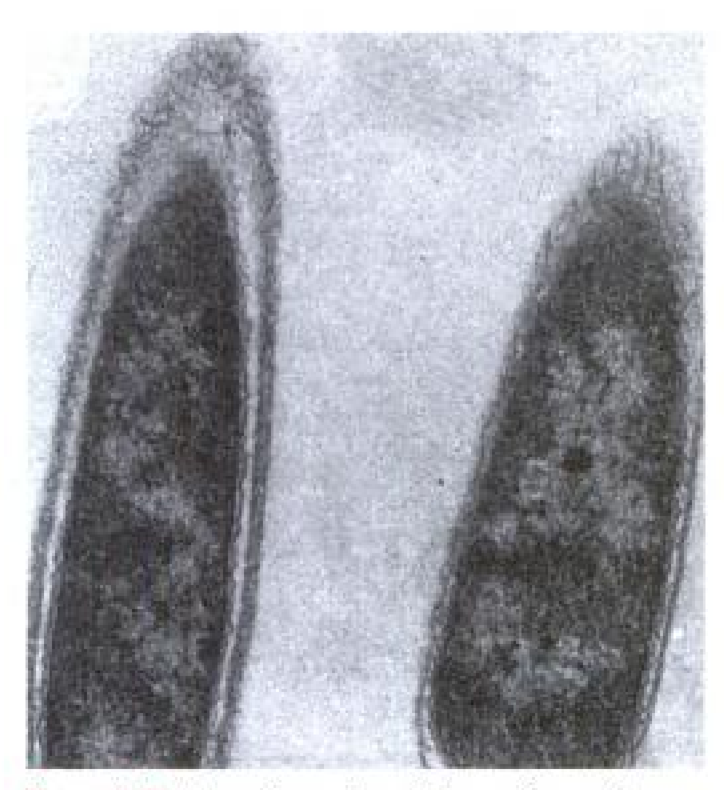


Figure II.46 – **La gaine chez *Sphaerotilus natans* × 11 000 et 15 000.**
(Institut Pasteur de Lille, A. Petitprez et al.).
La gaine est de nature glucido-lipido-polypeptidique ; la structure enchevêtrée caractéristique des protéines apparaît, ici, nettement.

Figure II.47 – **Acide aldobionique.**

Copyrighted material

ose associé à un acide uronique par une liaison osidique. Les acides uroniques peuvent être différents selon les souches de l'espèce : acide glucuronique, acide galacturonique, acide cellobiuronique ; les oses aussi peuvent être de nature variée : glucose, galactose, rhamnose, osamine. Cette diversité dans la nature des constituants et dans leur enchaînement entraîne des spécificités antigéniques différentes. Elle est à la base de la classification sérologique de l'espèce Pneumocoque en de nombreux types.

D'autres bactéries à Gram positif synthétisent aussi des capsules de nature polyholosidique. Celle de *Str. pyogenes,* élaborée seulement au début de la phase exponentielle de croissance, est faite d'acide hyaluronique. Celle de *Leuconostoc mesenteroides* est constituée d'un polymère homogène, le dextran, libérant uniquement du glucose à l'hydrolyse. Chez *Cl. perfringens,* le polyholoside constitutif contient deux hexoses : le mannose et le glucose.

La capsule est encore de nature polyholosidique chez de nombreuses bactéries à Gram négatif : *K. pneumoniae, E. coli* type A, *H. influenzae.* Pour quelques bacilles à Gram positif, *B. anthracis, B. megatherium* et *B. subtilis,* les substances capsulaires sont des polypeptides constitués d'un seul type d'acide aminé, l'acide D-glutamique.

2.8.1.3. Fonctions

La capsule ne joue pas un rôle vital comme l'appareil nucléaire ou la paroi ; par exemple, une bactérie dépourvue de sa capsule peut croître et se multiplier. L'élaboration des substances capsulaires peut être favorisée par le milieu et, dans certains cas, elle exige la présence de précurseurs biochimiques (par exemple, saccharose pour le dextran). En l'absence de ces éléments, la bactérie ne forme pas de capsule mais elle conserve tous ses autres caractères et, transférée sur un milieu convenable, elle recommence à synthétiser une capsule. De même, l'élimination des constituants capsulaires d'une bactérie par hydrolyse enzymatique n'empêche pas cette bactérie de se reproduire. Par mutation enfin, ce pouvoir de synthèse peut être perdu, la cellule n'en restant pas moins viable.

Sans être indispensables à la bactérie, les substances capsulaires sont pourtant le support de propriétés physiopathologiques et immunologiques. Elles ont été surtout étudiées à propos des pneumocoques. Les pneumocoques capsulés sont pathogènes ; injectés à la souris, ils déclenchent en 24 heures une septicémie mortelle. Les mêmes cellules, acapsulées, perdent en même temps leur agressivité. Les substances capsulaires sont donc de véritables facteurs de virulence. Supports du **pouvoir infectieux**, elles empêchent les défenses de l'organisme hôte de se manifester en protégeant les bactéries de la phagocytose. Elles semblent exercer un **chimiotactisme négatif** vis-à-vis des leucocytes. En fait, le mécanisme intime de ce pouvoir est très mal connu.

Les substances capsulaires sont aussi le support de l'**antigénicité**. Injectées à un animal, elles l'obligent à élaborer des anticorps protecteurs mais aussi agglutinant, précipitant. Elles sont enfin responsables de la spécificité sérologique. La nature des polyholosides constitutifs évoqués plus haut et leur enchaînement la déterminent rigoureusement. Elle a permis de reconnaître actuellement plus de 7 types sérologiques chez le pneumocoque. Cette classification présente un intérêt diagnostique et épidémiologique certain.

D'un point de vue plus général et aussi plus pratique, il est évident que la **capsule protège la bactérie** non seulement dans l'organisme contre les phagocytes mais aussi dans l'environnement contre les nombreux prédateurs (protozoaires) dont le développement se fait à ses dépens. De même, les bactériophages sont incapables de se fixer et de pénétrer chez les bactéries capsulées. Enfin, le pouvoir agressif des agents physiques et chimiques ne peut se manifester vis-à-vis de bactéries capsulées. La capsule protège, par exemple, contre la **dessiccation**. Elle est donc un important facteur de survie contribuant au maintien et à la multiplication des espèces qui la possèdent.

2.8.2. Éléments extérieurs à la paroi

2.8.2.1. Couche S

La couche S *(S layer),* de quelques nanomètres d'épaisseur, est formée d'un ou de deux types de

Copyrighted material

polypeptides, parfois liés à des hydrates de carbone, arrangés en réseau d'aspect cristallin carré, hexagonal ou oblique (aspect comparable à celui de la cotte de mailles des chevaliers). Elle est résistante aux détergents et aux protéases. Chez les bactéries à Gram positif, elle se retrouve à l'extérieur du peptidoglycane auquel elle n'est pas liée de manière covalente, tandis que chez les bactéries à Gram négatif, elle se retrouve à l'extérieur de la membrane externe. Le lipopolysaccharide joue un rôle dans son ancrage. Elle sert probablement de filtre empêchant le passage des grosses molécules et a aussi des fonctions antiphagocytaires et antibactériophages.

2.8.2.2. Glycocalyx

Le glycocalyx est une couche constituée de polysaccharides fibrillaires qui entoure la paroi. Il s'agit d'un constituant universel du monde bactérien, difficile à voir au microscope électronique, rapidement perdu en culture *in vitro*. Le glycocalyx permet aux bactéries d'adhérer entre elles et de former des microcolonies sur les surfaces vivantes ou inertes. (voir chap. VII-3.3.1.1 *fig. VII.5*)

2.8.2.3. Zooglée

La zooglée est une formation volumineuse, parfois macroscopique, d'aspect glaireux, constituée d'amas de bactéries englobées dans leurs couches gélatineuses (ou glycocalyx) respectives. D'autres micro-organismes peuvent y être associés. Cette structure macroscopique joue un rôle dans certaines pathologies (par exemple, botryomycose du cheval). Elle représente aussi une défense vis-à-vis des antibiotiques qui ne diffusent que peu à l'intérieur de la formation.

En voici quelques exemples : le grain de botryomycose = zooglée de *Staphylococcus aureus* ; le grain de Kéfir (lait fermenté du Caucase) = zooglée de *Lactobacillus caucasicus* ; la gomme des sucreries = zooglée de *Leuconostoc mesenteroides*.

2.8.3. Cils et flagelles

Dans le monde des protistes inférieurs, on rencontre deux types de mouvement. Les algues bleues et les myxobactéries, d'une part, se déplacent par glissement sur un support solide (le mécanisme de ce mouvement est pour l'instant parfaitement inconnu), les eubactéries et les spirochètes, d'autre part, se meuvent grâce à des organes locomoteurs spécialisés : chez les eubactéries, ce sont les flagelles ; chez les spirochètes, il s'agit d'un filament axial finement enroulé autour de la cellule et fixé à ses deux extrémités.

2.8.3.1. Mise en évidence et structure

Les flagelles et les cils sont des organites extrêmement ténus, invisibles au microscope optique sur des cellules vivantes ; les flagelles sont des organites plus longs que les cils et, surtout, sont mobiles par rotation alors que les cils le sont par battements. Malgré cela en bactériologie, les termes flagelles et cils sont généralement considérés comme synonymes.

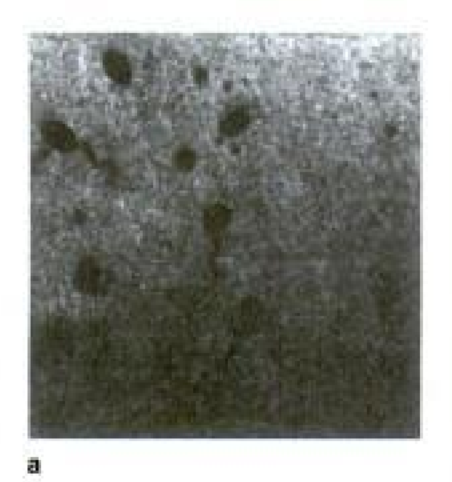
Leur mise en évidence doit utiliser les artifices des techniques de coloration. Toutes consistent à épaissir le diamètre de ces filaments en les traitant dans un premier temps par un mordant énergique, puis par une solution colloïdale qui, en se déposant à leur surface, les grossit considérablement et les rend visibles *(fig. II.48)*. La méthode classique de Leifson (fuchsine basique) et les techniques de Fontana-Tribondeau et de Rhodes (imprégnation argentique) reposent sur ces principes. Cependant, la meilleure méthode d'étude est l'observation au microscope électronique qui, seule, permet de détailler leur forme, leur mode d'insertion et leurs dimensions *(fig. II.49)*.

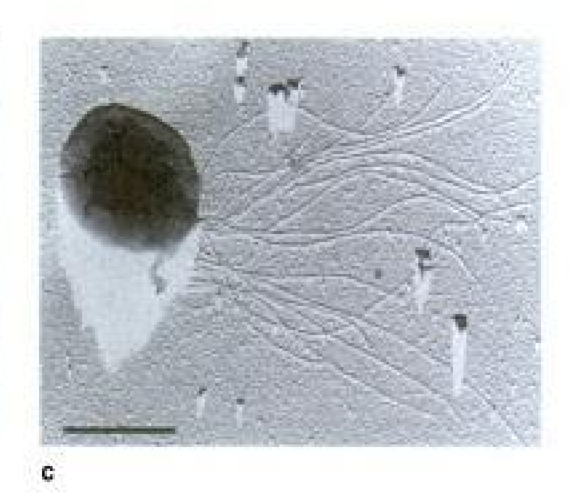
Les flagelles apparaissent sous la forme d'organites simples, filamenteux, sinueux, généralement plus longs que la bactérie elle-même, de l'ordre de 6 à 20 µm. La plupart du temps, leur épaisseur varie d'une espèce à l'autre : elle serait de 12 nm chez les *Proteus* et de 20 à 25 nm chez les vibrions et les *Pseudomonas*.

Chez le spirochète, le filament axial enroulé autour du corps cellulaire et attaché aux deux extrémités de la bactérie serait en réalité formé de deux touffes de fibrilles polaires venant se rejoindre en son centre. Ces filaments sont quelquefois si nombreux qu'ils peuvent former un bourrelet ou une crête *(crista)* tout le long du corps cellulaire.

La connaissance du mode d'insertion des flagelles peut être mise à profit dans un but pratique de

Copyrighted material

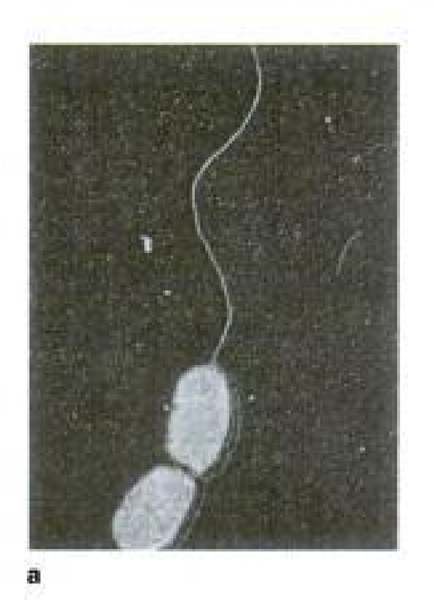


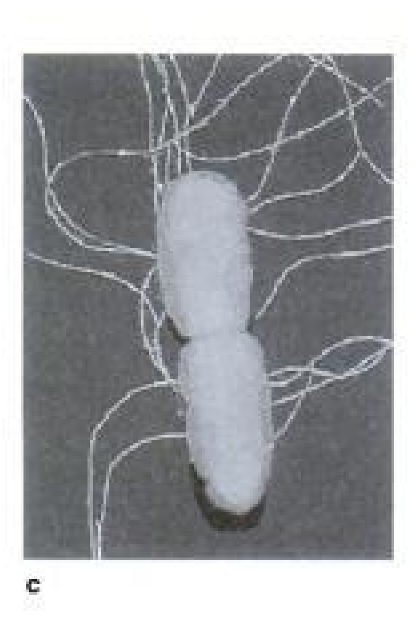


a b c

Figure II.48 – Bactéries ciliées après coloration.

a : *Aeromonas hydrophila* ; cils polaires, × 1 320 ; b : *Proteus vulgaris* ; cils péritriches, × 17 500 ; c : *Thermococcus chitonophagus* en M.E.T. après ombrage au platine ; cils lophotriches.





a b c

Figure II.49 – Bactéries ciliées observées en microscopie électronique.

a : *Vibrio metchnikowi*, × 12 000 ; b : *Proteus vulgaris*, × 25 000 ; c : *E. coli*, × 15 000.
(Photo c reproduite avec l'aimable autorisation du Prof. Dr. K O Setter et du Dr. Reinhard Rachel, Université de Regensburg, Centre des Archées, D-93040 Allemagne).

diagnostic. On distingue deux types principaux d'insertions : **polaire** et **péritriche**. Dans le système polaire, le ou les cils sont insérés à une ou aux deux extrémités de la cellule ; la bactérie est **monotriche** si l'on ne rencontre qu'un seul flagelle à l'une de ses extrémités, **amphitriche** lorsqu'un flagelle émerge à chacun des pôles, **lophotriche** lorsqu'une touffe de cils apparaît à l'une ou aux deux extrémités. Dans le système **péritriche**, la bactérie porte de très nombreux cils insérés sur tout le pourtour de la cellule. L'intérêt de ces notions est évident en taxonomie : ainsi, dans la famille des *Pseudomonadaceae*, les bactéries sont généralement mobiles grâce à des flagelles polaires ; dans la famille des *Enterobacteriaceae*, toutes les cellules mobiles possèdent un système flagellaire péritriche. Les images observées au microscope électronique et les études de diffraction aux rayons X ont précisé la structure des flagelles : ils seraient constitués par des chaînes polypeptidiques arrangées parallèlement ou enroulées en hélice autour de l'axe du flagelle. Chez *S. typhi murium*, ils seraient formés par des sous-unités globulaires alignées parallèlement à l'axe.

Les flagelles peuvent être détachés mécaniquement de la cellule et purifiés par centrifugation différentielle. L'analyse chimique révèle la présence d'une protéine majeure, d'une masse molaire de 30 à 40 kd, la **flagelline**. De la classe des

Copyrighted material

kératomyosines, elle contient les 14 acides aminés habituels de ces protéines, la cystéine exceptée.

Le point d'insertion des flagelles est probablement cytoplasmique. Les expériences au cours desquelles la paroi bactérienne est détruite par le lysozyme, aboutissant ainsi à la formation de protoplastes ciliés, prouvent en effet que le point d'origine du cil est le protoplasme et non la paroi. De nombreuses et magnifiques images de microscopie électronique (technique de l'ombrage) montrent que le flagelle traverse la paroi et semble prendre racine dans le cytoplasme au niveau d'**un granule basal** d'assez fortes dimensions, de structure complexe par ses liaisons avec les enveloppes cellulaires.

Ce corps basal comprend deux anneaux protéiques. Le plus interne est relié à la membrane cytoplasmique ; le plus externe, visible surtout chez les bactéries à Gram négatif, est relié au LPS et au peptidoglycane *(fig. II.50)*.

La croissance du flagelle est assurée non à partir de la base mais par un prolongement de l'extrémité : les molécules de flagelline formées dans la cellule qui traversent la partie centrale creuse du flagelle et s'additionnent à l'extrémité terminale. Ce processus de synthèse est appelé **autoassemblage**, toutes les informations pour la structure finale du flagelle résidant dans les sous-unités protéiques elles-mêmes. Lorsqu'une fraction de l'extrémité est brisée, elle est régénérée.

2.8.3.2. Fonctions

2.8.3.2.1. Mobilité

Les bactéries flagellées se déplacent dans les milieux liquides ou à la surface des géloses molles qu'elles recouvrent parfois en formant un véritable film. Cet envahissement est classique chez les *Proteus* ou les *Pseudomonas* ; il constitue un inconvénient majeur au cours de l'isolement des espèces en masquant la présence des autres bactéries.

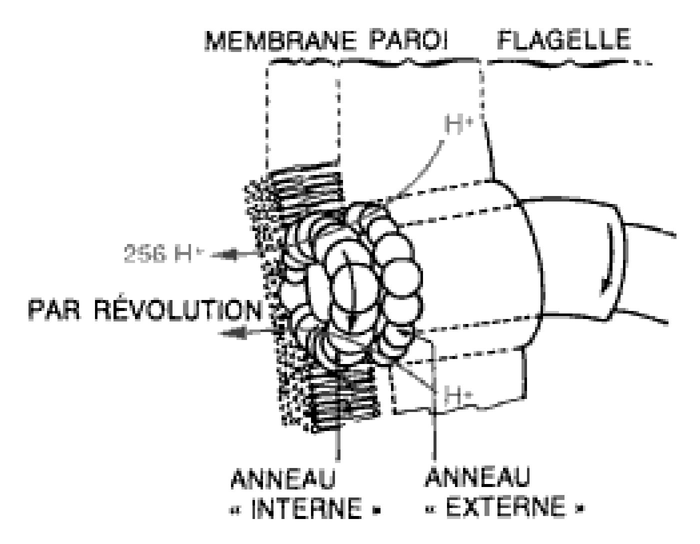


Figure II.50 – **Structure schématique du corps basal d'un flagelle d'une bactérie à Gram négatif.**

L'anneau interne (rotor) comporte 16 sous-unités pouvant être mises en mouvement par un flux de protons.

Pour mieux mettre en évidence ce mouvement, on ensemence un milieu faiblement gélosé, en piqûre centrale : les bactéries immobiles se développent le long de la piqûre, les cellules mobiles envahissent toute la masse.

Pour expliquer le phénomène de mobilité des cils, on a évoqué une modification de forme ou de position des molécules protéiniques par analogie avec la contraction musculaire. L'énergie nécessaire proviendrait d'un gradient de protons (voir chap. IV). Le déplacement d'une bactérie à la vitesse de 10 μm^{-1} exige une quantité d'énergie équivalente à celle fournie par 2 % du métabolisme cellulaire. Les bactéries aérobies conservent leur mobilité en anaérobiose à condition qu'on leur fournisse de l'arginine ; le système enzymatique mis en cause est l'arginine dihydrolase qui conduit à la formation d'ornithine en même temps qu'il libère de l'ATP. Le flagelle, par contre, aurait une structure rigide qui se déplacerait par rotation à la manière d'une hélice. Le mouvement serait déclenché à partir du granule basal qui agirait à la façon d'une turbine, les deux anneaux internes (membrane) représentant l'un le moteur (rotor mobile) l'autre le stator (fixe).

La nature exacte de ce mouvement tourbillonnant commence à être élucidée. Le rotor est constitué d'une protéine membranaire de 16 sous-unités identiques disposées en anneau *(fig. II.50)*. L'autre anneau protéique, relié à la paroi, constitue le stator. L'énergie provient du gradient de protons (voir chap. IV). Des mesures réalisées chez *E. coli* ont montré que, pour une révolution du flagelle, un flux entrant d'environ 250 protons est nécessaire. Il est vraisemblable que le passage d'un proton à travers chacune des 16 sous-unités fasse tourner le système de 1/16 de tour et que, donc, il faille au total 16 × 16 soit 256 protons pour réaliser un tour.

2.8.3.2.2. Chimiotactisme

Les bactéries mobiles sont douées de **chimiotactisme** (ou **chimiotaxie**). Certaines substances (sucres, acides aminés) les attirent ; d'autres (phénols, acides, bases) les repoussent. Il existe donc une chimiotaxie positive et une négative. La réponse cellulaire vis-à-vis de ces composants serait due à un gradient d'informations plutôt qu'à un gradient d'énergie comme on l'a supposé durant de longues années.

Les bactéries « sentent » leur environnement grâce à des **récepteurs chimiques** spécifiques (une vingtaine chez *E. coli*) présents dans la membrane cytoplasmique. Leur spécificité n'est pas absolue ; c'est ainsi que le récepteur du galactose reconnaît également le glucose et le saccharose. Il y en a trois types, chacun s'occupant de la réponse à un petit groupe de substances chimiques.

Le premier intervient dans la réponse aux acides aminés, les deux autres dans la réponse aux glucides et aux dipeptides

Copyrighted material

(*fig. II.51*). Pour les deux premiers, la liaison se traduit directement par un signal cytoplasmique. Pour le deuxième, une étape préliminaire de transfert à travers l'espace périplasmique a lieu par l'intermédiaire des protéines « de liaison de substrat » (voir § 2.3.3.2.2.) puis la liaison au récepteur membranaire se traduit en signal cytoplasmique. Il semble que l'étape première de ce signal soit une méthylation de la partie cytoplasmique de ces récepteurs. Elle est catalysée par une enzyme soluble, la méthyl transférase, agissant au niveau de groupements carboxyles libres sur des résidus glutamates (jusqu'à quatre par récepteur). Pour cette raison, les récepteurs sont appelés « protéines méthylables de chimiotaxie » (MCP : *methyl accassing chemotaxis proteins*). Une succession de phosphorylations en cascade de protéines (médiateurs intracellulaires, *fig. II.51*) couple cette activation des récepteurs à la modification de la rotation flagellaire, modifiant ainsi le déplacement de la bactérie.

Ainsi, lors du déplacement des bactéries ou « nage », la présence ou l'absence de signal chimiotactique modifie les positions des flagelles et fait que soit des périodes de nage régulière sont fréquemment interrompues par des changements de direction aléatoires (absence de signal), soit des pivotements sont partiellement supprimés et la nage reprend dans une direction privilégiée vers une zone de plus forte concentration en signal (*fig. II.52*). Le phénomène de ***swarming,*** quelquefois observé dans les laboratoires, est un type de comportement chimiotactique. Des bactéries inoculées au centre d'une gélose métabolisent le nutriment dans leur voisinage immédiat, créant ainsi leur propre gradient chimique. Elles vont ensuite se déplacer à partir du centre, suivant ce gradient, en formant un anneau de croissance où plusieurs composés nutritifs seront successivement métabolisés. Le *swarming* caractéristique de certaines souches très mobiles de *Pr. vulgaris* en est un exemple. Finalement, ces étapes successives se traduisent par l'application d'anneaux concentriques sur le milieu gélosé.

2.8.3.2.3. *Propriétés antigéniques*

Les flagelles confèrent à la bactérie de nouvelles propriétés antigéniques. L'**agglutination** observée en présence d'anticorps correspondants est du type floconneux par opposition à celle donnée par les antigènes du corps bactérien (antigènes somatiques O). La spécificité des antigènes flagellaires repose sur le nombre et la séquence des acides aminés dans la molécule protéinique ; elle peut être propre à une espèce ou aux différentes sou-

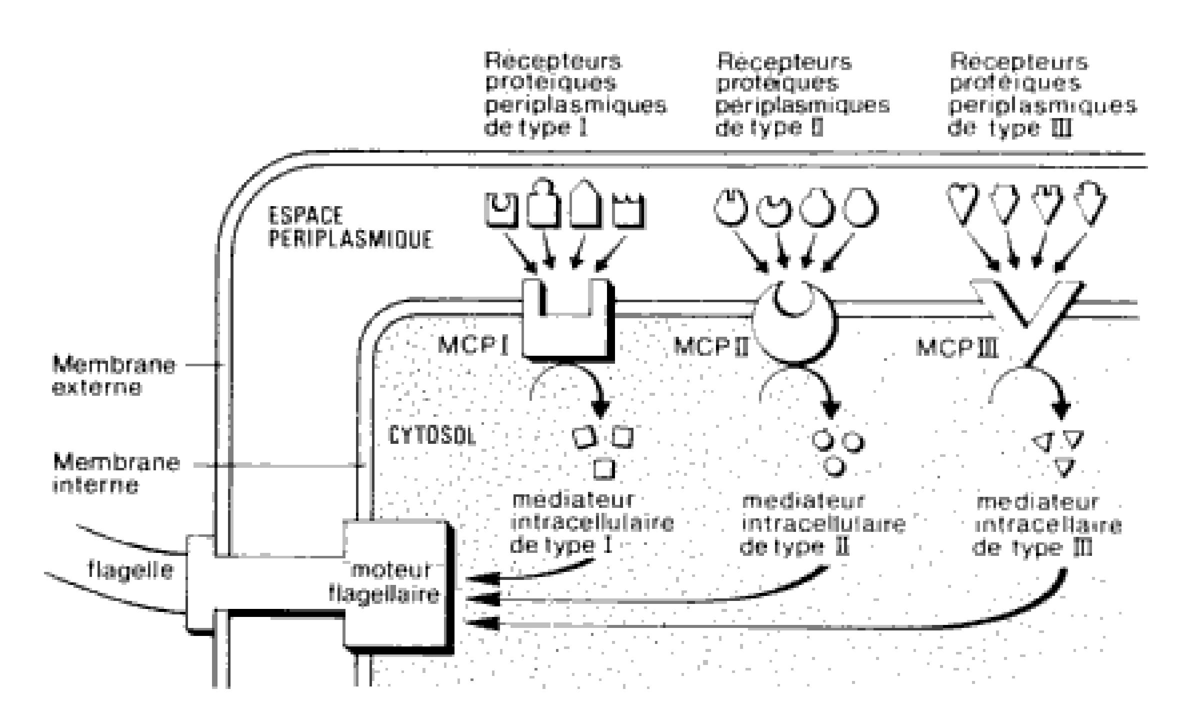


Figure II.51 – **La chimiotaxie bactérienne ; étapes de la transduction du signal.**

Les substances attractives se fixent à des récepteurs protéiques dans l'espace périplasmiques ; ceux-ci agissent sur l'une des 3 protéines méthylables (MCP) ;
Le médiateur cellulaire produit à la suite de cette intéraction permet au « moteur » flagellaire de poursuivre son mouvement dans le sens inverse des aiguilles d'une montre ; les pivotements sont supprimés, la nage est lente et continue.

Copyrighted material

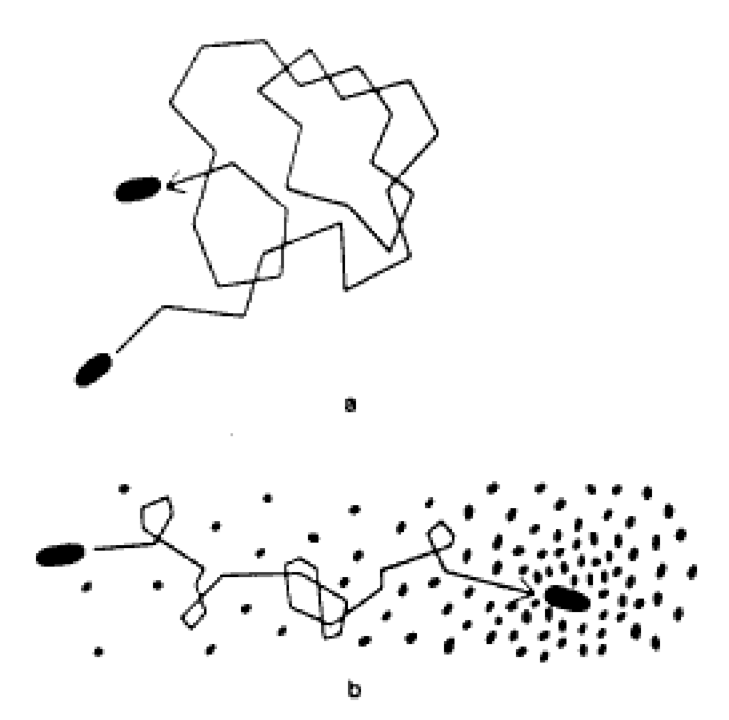


Figure II.52 – **Schéma des trajectoires de nage de la bactérie.**

En l'absence de substance attractive (a) les périodes de nage sont interrompues par des pivotements brefs qui changent au hasard la direction de la nage.

En présence d'une substance attractive (b) les pivotements sont supprimés et la bactérie progresse vers le signal chimiotactique. *(In « Biologie moléculaire de la cellule », Flammarion Médecine Sciences, Paris 1986).*

ches de la même espèce. Ces différences ont été exploitées pour la caractérisation immunologique des types bactériens. La classification des *Salmonella* par Kaufmann-White en est l'exemple le plus remarquable.

2.8.4. *Pili ou frimbriae*

L'existence d'appendices filiformes différents des flagelles a été révélée par le microscope électronique. Ils sont fréquents chez les bacilles à Gram négatif, rares chez les formes à Gram positif. On leur a donné le nom de *pili* (ou *fimbriae*). On en distingue deux catégories, de morphologie et de fonction distinctes : les *pili* communs (de type I) et les *pili* sexuels.

Les premiers sont distribués en grand nombre autour de la bactérie (jusqu'à plusieurs centaines). Ils sont ténus, courts, rigides et donc cassants. On pense, d'une façon générale, que leur présence est en rapport avec les propriétés **hémagglutinantes** de la bactérie.

Les seconds sont plus longs, atteignant 20 µm, et se terminent par un renflement. Leur nombre, faible, varie de 1 à 4. Ils paraissent jouer un certain rôle au cours de la **conjugaison bactérienne**, bien qu'il ne soit pas clairement défini. Il est possible qu'ils interviennent dans la reconnaissance entre bactéries « mâles » qui sont les seules à en posséder et bactéries « femelles », ou dans le transfert du chromosome (voir chap. VI), le diamètre du canal central des *pili* étant légèrement supérieur à celui du duplex chromosomique. On sait aussi qu'à l'extrémité renflée de ces *pili* sexuels peuvent se fixer spécifiquement certains phages qui injectent leur matériel génétique par le canal des *pili*.

Les *pili* peuvent être facilement séparés par simple agitation. Ils sont constitués d'une protéine associant des sous-unités d'une masse molaire d'environ 17 000 daltons, appelés **pilines**. Ces sous-unités libérées par chauffage ou par traitement à l'acide peuvent reformer à froid et à pH neutre la structure protéinique originelle.

Un groupe de bactéries à Gram positif, les *Streptococcus*, porte une couche externe de protéines filamenteuse, les **protéines M** *(fimbriae)*, qui représentent l'antigène de surface essentiel des *Streptococcus* et qui permettent leur adhésion dans les tissus de l'hôte.

2.9. Spores bactériennes

Certaines bactéries ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques douées d'une résistance extraordinairement élevée lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs ou lorsque les conditions physico-chimiques extérieures changent. On les appelle **spores** ou **endospores** puisque leur formation est intracellulaire. Ces structures particulières ont retenu l'attention des premiers bactériologistes. Pasteur note leur existence chez le bacille de la flacherie des vers à soie puis chez le bacille butyrique. Prévot, à l'Institut Pasteur de Paris, démontre leur exceptionnelle résistance en prélevant des spores à l'intérieur des momies embaumées depuis plusieurs millénaires ; en quelques heures d'incubation à 37 °C dans un milieu favorable, il obtient d'abondantes cultures.

Les spores, dans des conditions physico-chimiques favorables, peuvent retourner à la forme végétative. Le **cycle sporal** caractérise ces transformations où alternent les phases végétatives de

Copyrighted material

croissance, le processus de sporulation et la germination.

Les endospores caractérisent trois principaux genres bactériens : les *Bacillus*, les *Clostridium* et les *Sporosarcina*. Tous ces germes sont à Gram positif surtout au cours de la phase exponentielle de leur croissance ; ils ont ensuite tendance à devenir Gram négatif. La plupart *(Bacillus, Clostridium)* sont mobiles par cils péritriches. Pour la plupart également, la teneur en G + C de leur ADN est comprise entre 30 et 40 %. Leur habitat naturel est le sol. Quelques espèces seulement jouent un rôle important en pathologie infectieuse humaine ou animale par la production de toxines. Ce sont, par exemple, *Cl. perfringens*, agent de la gangrène gazeuse, *Cl. botulinum*, responsable du botulisme, *Cl. tetani*, agent du tétanos et *B. anthracis*, à l'origine de la maladie du charbon.

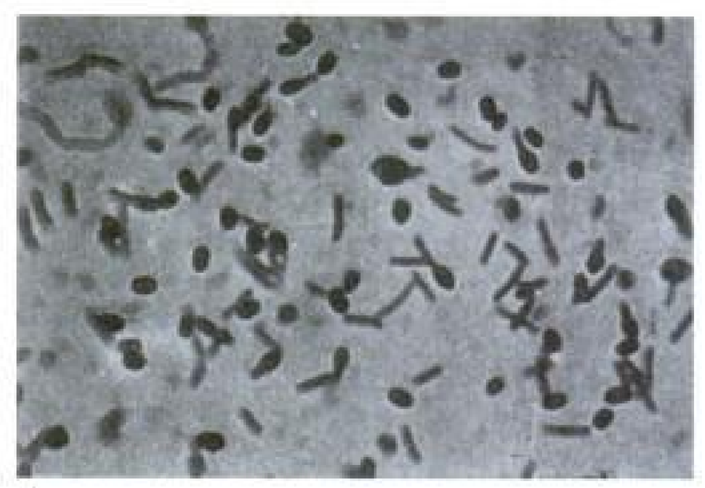
2.9.1. Morphologie et structure

Pour étudier la morphologie des spores, on utilise des techniques de coloration spéciales fondées, par exemple, sur l'alcoolo-acido-résistance des cellules (coloration de Möller). Sur la bactérie vivante, la spore apparaît comme un espace clair, réfringent, ovoïde, limité par un contour régulier. Elle peut déformer ou non le corps microbien. Sa position dans la cellule est recherchée dans un but taxonomique : elle est en effet centrale chez certains *Bacillus*, subterminale chez les *Clostridium*, terminale chez les *Plectridium* *(fig. II.53)*.

La spore libre observée en microscopie électronique présente une structure complexe résultat de ces modifications cytologiques et biochimiques. La région cytoplasmique centrale présente une texture homogène et dense aux électrons. Elle comprend des zones claires correspondant au matériel nucléaire, les autres régions, sombres, localisant les acides ribonucléiques et les substances de réserve.

Les enveloppes constituées autour de la membrane sporale ont des structures et des compositions variées. Sur le schéma de la *figure II.54*, on distingue :

– la **paroi sporale**, contenant le peptidoglycane normal qui deviendra, après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative ;



a



b



c

Figure II.53 – Spores.
a : terminales et libres chez *Plectridium* ;
b : centrales et libres chez *Bacillus* ;
c : terminales déformantes chez *Clostridium*.

– le **cortex**, qui représente de 10 à 20 % de l'ensemble et qui est une couche épaisse d'aspect monomorphe, très transparente aux électrons ; il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec

Copyrighted material

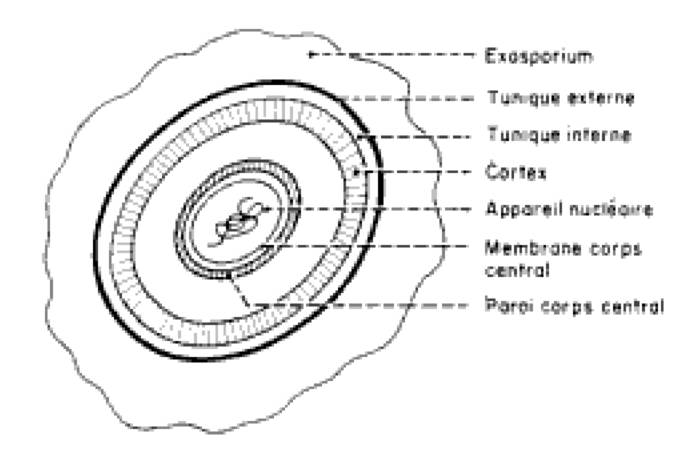


Figure II.54 – **Structure de la spore bactérienne.**

beaucoup moins de liaisons internes et est très sensible au lysozyme ; il contient une forte proportion de dipicolinate de calcium ; son autolyse constitue une étape déterminante de la germination ;

– les **tuniques** (interne et externe), qui représentent de 20 à 35 % de l'ensemble ; elles sont composées d'une protéine de type kératine riche en liaisons disulfures ; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques ;

– l'**exosporium** enfin, la couche la plus externe, qui est une membrane lipoprotéinique contenant 20 % de sucres ; il n'est pas essentiel à la survie de la spore.

2.9.2. Phénomène de sporulation

La spore, qui prend naissance dans la cellule végétative, est une cellule entièrement nouvelle et différente du point de vue structure, composition chimique et enzymatique. Les observations faites tendent à montrer que les endospores, qu'elles proviennent des *Clostridium* ou des *Bacillus*, présentent à peu près la même nature et les mêmes propriétés. Le phénomène de **sporulation** est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimique qui peut être variable suivant les espèces. Si l'on désigne par t0 le temps zéro de la sporulation, c'est-à-dire celui qui correspond à une cellule bactérienne en phase stationnaire de croissance (après la phase exponentielle), la formation de la spore va durer environ 7 heures (de t0 à t7).

2.9.2.1. Événements cytologiques

Du point de vue cytologique, la sporulation peut être décomposée en plusieurs étapes, comme le schématise la *figure II.55* dans le cas de *B. subtilis* (voir *fig. II.56*).

• Stade 1 (a). Dans la cellule végétative en phase de croissance stationnaire, donc en l'absence de division, la sporulation débute avec l'arrêt total de la synthèse d'ADN, d'ARN (ribosomes) et donc de protéines. Le premier changement visible consiste dans la conversion du *nucleus* compact en un **filament chromatique** axial qui s'étend sur presque toute la longueur de la cellule.

• Stade 2 (b). Le filament nucléaire se condense à une extrémité. En même temps que s'individualise le futur appareil nucléaire de la spore (comportant l'intégralité du patrimoine génétique), une division cellulaire asymétrique s'amorce avec croissance interne d'une double structure membranaire qui forme un **septum transversal** subpolaire et partage la cellule en deux parties inégales : l'une, petite, donnera naissance à la spore ; l'autre, plus importante, correspondant à la cellule végétative qui porte la spore embryonnaire, est appelée **sporange**.

• Stade 3 (c). La synthèse de ce septum se poursuit au cours du troisième stade et localise une zone lisse, transparente, entièrement autonome, comprenant un appareil nucléaire, un cytoplasme et une double membrane continue, l'une cytoplasmique, l'autre préfigurant la future paroi. C'est la **préspore**. Contrairement à ce qui se passe au cours de la division cellulaire, on n'observe pas, ici, la synthèse d'une paroi transversale qui sépare la cellule mère en deux cellules filles. À ce stade, la préspore est parfaitement visible au microscope électronique.

• Stades 4 à 6 (d, e). Dans le sporange, la préspore va « mûrir » progressivement en s'entourant d'un certain nombre de **téguments** ou **enveloppes**. Au cours de la **maturation**, c'est la double membrane sporale qui engage le processus de synthèse active de ces nouvelles couches : la paroi sporale et le cortex forment entre les faces internes de la double membrane, la tunique sporale et l'exosporium qui se disposent à l'extérieur.

Copyrighted material

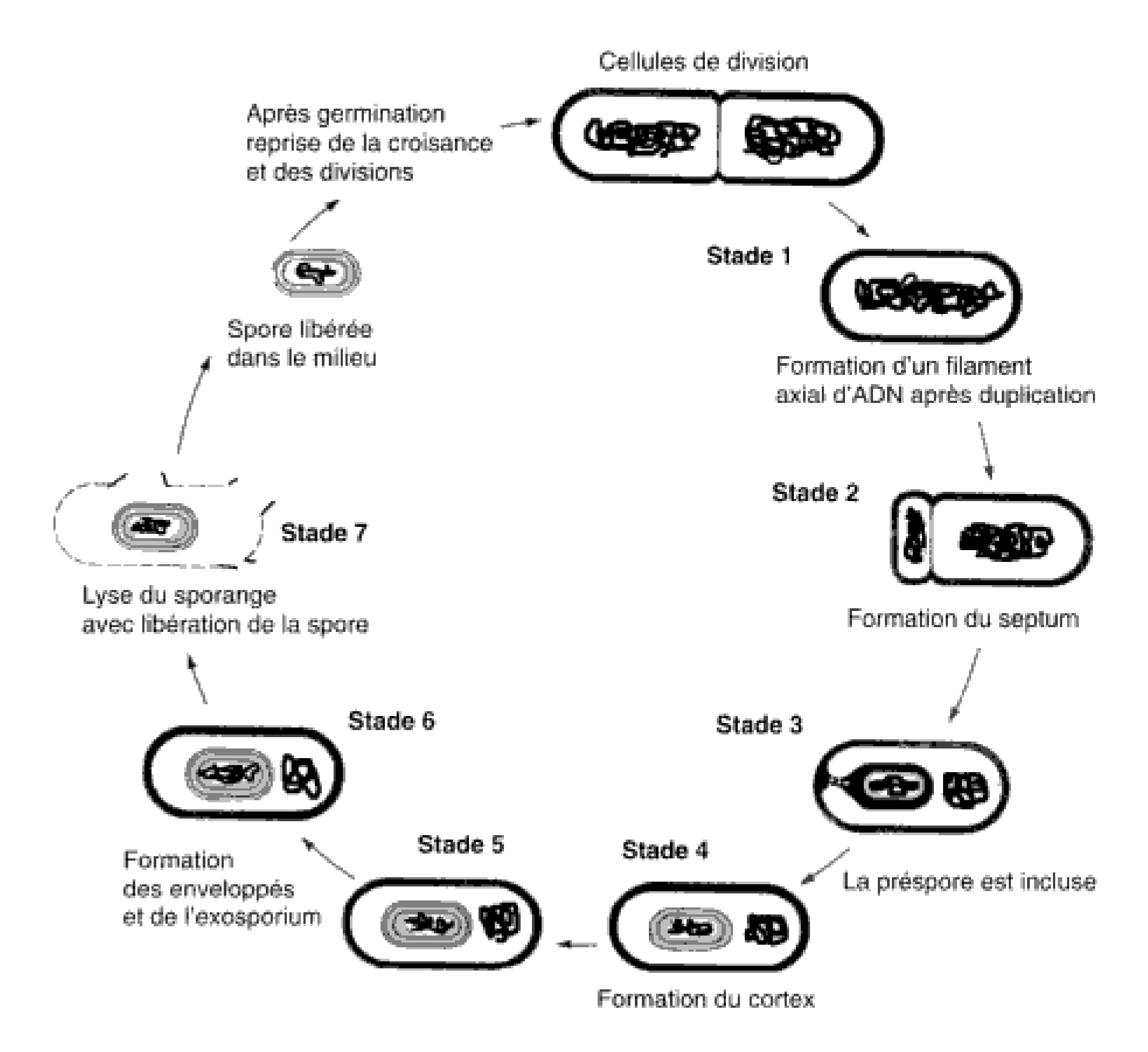


Figure II.55 – **Schéma des principales étapes de la sporulation.**

2.9.2.2. Physiologie de la sporulation

Les modifications structurales qui caractérisent le phénomène de sporulation coïncident avec un véritable bouleversement des activités métaboliques de la cellule.

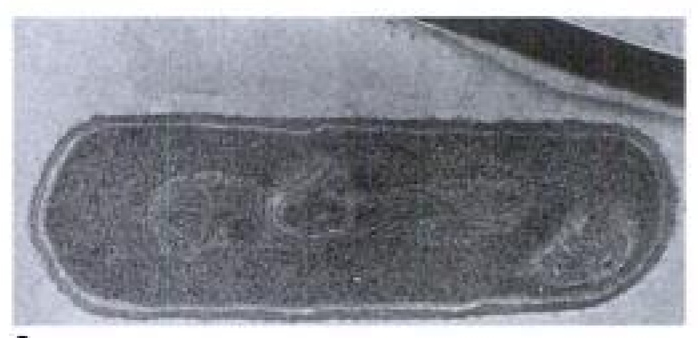
Dans le cytoplasme de la spore mûre, individualisée et libérée, la plupart des enzymes de la cellule végétative sont dégradées et remplacées par un lot de constituants de la spore. Le cytoplasme sporal est encore appelé core. Il contient un appareil nucléaire identique à celui de la cellule végétative, tout l'appareil nécessaire à la synthèse des protéines et, enfin, un système producteur d'énergie tiré de la glycolyse et faisant appel aux flavoprotéines comme transporteurs d'électrons.

Avec *B. subtilis,* comme avec de nombreux autres *Bacillus,* le cycle de Krebs, incomplet et inactif au cours de la croissance, est intégralement reconstitué grâce à la synthèse des enzymes manquantes. À la suite de remaniements, la chaîne respiratoire assure l'oxydation complète des métabolites accumulés au cours de la croissance et la production d'ATP indispensable aux néosynthèses.

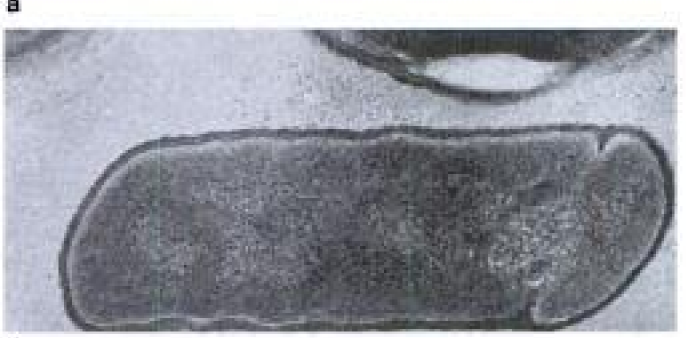
2.9.2.2.1. Acides aminés et protéines

On assiste à un renouvellement rapide des protéines. De nombreuses enzymes protéolytiques existant au cours de la croissance ou réprimées sont synthétisées : amylases, protéases, nucléases au stade 1 ; alanine déshydrogénase au stade 2 ; phosphatase alcaline au stade 3, etc. Certaines d'entre elles, non indispensables à la formation de la spore, sont excrétées. Le changement le plus significatif est l'augmentation du pool des acides aminés

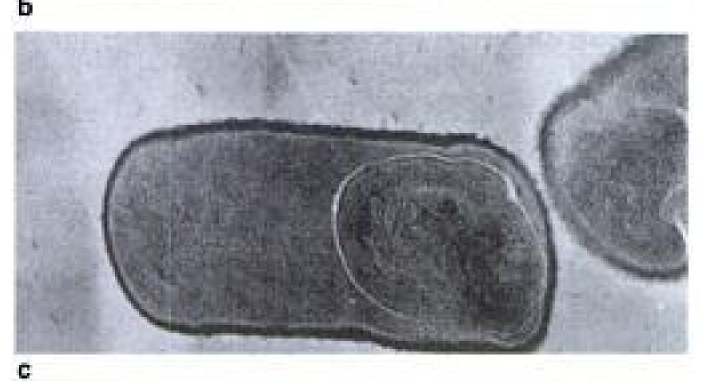
Copyrighted material



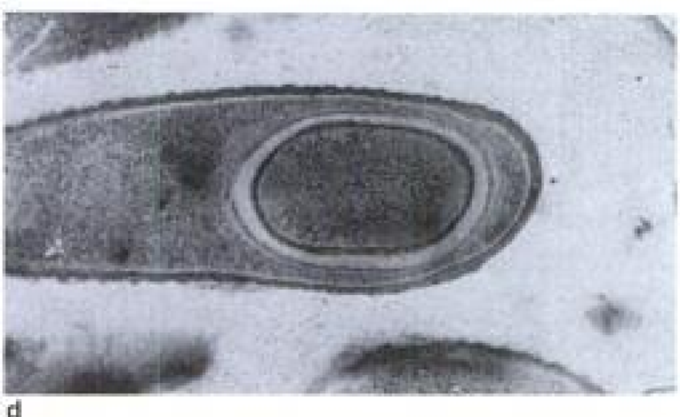
a



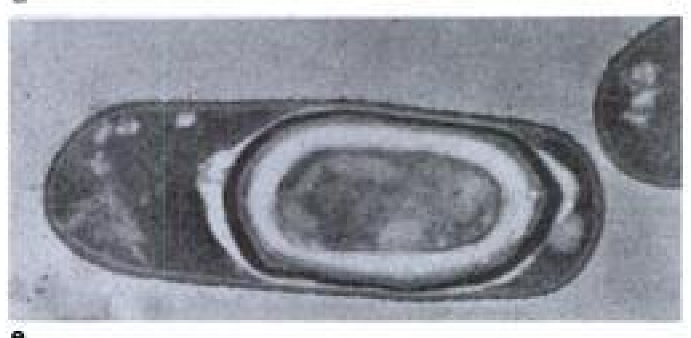
b



c



d



e

Figure II.56 – **Les cinq stades principaux de la sporulation chez *Bacillus subtilis*.**

Clichés pris en microscopie électronique × 20 000 *(Photo publiée avec l'aimable autorisation de Mme Ryter, Institut Pasteur).*

libres : acide N-succinylglutamique au stade 1, acide sulfolactique aux stades 2 et 3, acide dipicolinique aux stades 3 et 5.

2.9.2.2.2. *Acides nucléiques*

Au stade 3, la teneur en ARN diminue. Les ARN messagers et les ARN de transfert continuent à être synthétisés ; en revanche, la synthèse des ARN ribosomaux est stoppée, leurs constituants servant à alimenter le pool nucléotidique nécessaire pour de nouvelles synthèses. Il en va différemment de l'ADN dont la formation se poursuit jusqu'au stade 2. Il s'agit d'une production résiduelle qui correspond à la duplication du chromosome amorcée à t0 sans qu'une réplication nouvelle soit engagée par la suite. Au stade 2, tous les sporanges sont binucléés : l'un formera l'appareil nucléaire sporal, l'autre sera détruit au cours de la lyse ultérieure du sporange.

2.9.2.2.3. *Enveloppes*

Les études d'incorporation de précurseurs marqués permettent de suivre l'élaboration des constituants des enveloppes. La synthèse accélérée de phospholipides entre stades 1 et 3 correspond à la formation du septum membranaire de sporulation et à sa progression autour de la préspore. Autour de cette membrane, l'existence d'une **fine paroi** (future paroi de la cellule végétative) provient de la synthèse des unités mucopeptidiques au stade 1. Le glycosaminopeptide formé au stade 3 est incorporé dans les structures corticales. Ce sont ensuite les protéines de type kératine qui sont synthétisées en grande abondance et qui forment les deux tuniques interne et externe.

En fin de compte, au niveau de la spore libre, toutes les activités métaboliques sont en « sommeil », l'essentiel des synthèses, notamment enzymatiques, y étant presque nul. Pour cette raison, on donne à cette cellule le nom de **spore dormante**.

2.9.2.3. *Génétique de la sporulation*

Le phénomène de sporulation résulte d'un engagement irréversible de différenciation cellulaire dont la nature est inconnue. Il est possible, en effet, de prolonger la croissance exponentielle des cellules par une réalimentation du milieu aux stades 1 à 2, cette possibilité est exclue.

Copyrighted material

Dans une population de bactéries en phase exponentielle de croissance, il existe un choix exclusif pour chaque cellule de poursuivre sa croissance végétative ou de s'engager dans le processus de sporulation. Cette probabilité est variable en fonction des conditions physico-chimiques et nutritionnelles. En fin de croissance, elle est de 1 quel que soit le milieu. L'étude des facteurs conditionnant cette probabilité montre que celle-ci est due à une répression des gènes de sporulation par des catabolites azotes. L'**épuisement** des sources carbonées et azotées en fin de croissance détermine le processus irréversible de sporulation.

La sporulation est génétiquement commandée. Les gènes qui conditionnent l'événement sont très nombreux (plusieurs dizaines). Plusieurs types de mutants de sporulation ont été décrits. Les uns, mutants asporogènes, appelés spo ou mutants normaux, existent à chacun des stades de la sporulation : mutants spo 0, spo 1, spo 2… spo 6. Il est donc clair qu'il existe toute une série de gènes de sporulation non exprimés durant la croissance et susceptibles d'intervenir à chacune des étapes du phénomène.

Ces mutants **asporogènes** sont bloqués dans la biosynthèse d'un métabolite essentiel et ils accumulent ou excrètent donc le substrat de la réaction qu'ils sont incapables d'induire selon qu'il s'agit de macromolécules ou de petites molécules. Ce sont des mutants nutritionnels. Ainsi, un mutant incapable de synthétiser l'acide dipicolinique (spo 4) peut cependant sporuler lorsque ce métabolite lui est fourni. À côté de ces mutants asporogènes, normaux, on a décrit des mutants « monstrueux » ou « aberrants », présentant des anomalies profondes de structure comme l'absence d'une des enveloppes caractéristiques.

2.9.3. Propriétés

2.9.3.1. Thermorésistance

La **thermorésistance** est certainement une des propriétés les plus étudiées chez la spore. Elle varie considérablement d'une espèce à l'autre ou entre les souches d'une espèce ou encore selon l'environnement. D'une façon générale, les spores survivent après un chauffage de 70 à 80 °C durant 10 minutes. Certaines *(Plectridium caloritolerans)* résistent plus de 8 heures à 100 °C et 5 minutes à 120 °C. Cette thermorésistance des spores pose des problèmes difficiles au cours des opérations de **stérilisation** aussi bien dans les hôpitaux et les salles de chirurgie que dans l'industrie alimentaire où l'on recherche les moyens les plus adaptés à la stabilisation des conserves (voir chap. V).

La thermorésistance de la spore, de nombreuses données le suggèrent, est en rapport avec la présence d'un constituant chimique spécifique, absent des formes végétatives, l'acide dipicolinique (acide pyridine-2-6-dicarboxylique). Ce composé, découvert en 1953 par Powell et Srang, n'avait jamais été isolé chez les procaryotes ou les eucaryotes. Formé exclusivement au cours de la sporulation, il est vraisemblablement produit à partir de l'acide diaminopimélique. Il se trouve sous forme de **dipicolinate de calcium** *(fig. II.57)* et représente de 10 à 15 % du poids sec de la spore. Le rôle de cette association est aisément démontré : en remplaçant le calcium par le strontium, on obtient des spores **défectives**, thermosensibles. Un autre constituant, l'acide L + N-succinyl-glutamique, inexistant dans les cellules végétatives et synthétisé dès les premiers stades de la sporulation, est également susceptible de jouer un rôle dans la thermorésistance.

Cette propriété conférée par l'association Ca^{++}-DPA peut sans doute être expliquée par d'autres facteurs : l'état déshydraté des constituants cytoplasmiques, l'imperméabilité des enveloppes. Le contenu en eau de la spore est extrêmement bas, entre 15 et 20 % du poids, alors que celui d'une cellule végétative est d'environ 80 %. On connaît parfaitement le haut degré de résistance à la dénaturation thermique des protéines ou des acides nucléiques lorsqu'ils sont à l'état anhydre. La **déshydratation** progressive de la spore au cours de sa maturation constitue, à n'en pas douter, un des événements majeurs conditionnant la propriété de thermorésistance. Cela est tellement vrai que le premier stade de la germination de la spore est marqué par une réhydratation, un gonflement de la cellule en même temps qu'une solubilisation de l'acide dipicolinique qui est libéré dans le milieu extérieur. Cet état déshydraté est conservé grâce à l'imperméabilité des enveloppes et, principalement, du cortex. Finalement, l'acquisition de la thermorésistance de la spore, parallèle à celle de sa **réfringence**, est étroitement et peut-être uniquement dépendante de la synthèse du dipicolinate de calcium, composé qui assure à la cellule sporale son imperméabilité et son état de déshydratation très poussé.



Figure II.57 – **Diplocolinate de calcium.**

Copyrighted material

2.9.3.2. Résistance aux agents physico-chimiques

La spore n'est pas uniquement thermorésistante. Sa résistance est aussi significative vis-à-vis d'autres agents physiques comme les rayons UV, les rayons X et, surtout, les ultrapressions. Les spores seraient les formes de vie connues les plus résistantes dans ce domaine.

Enfin, le contact avec de nombreux agents chimiques ne semble pas exercer une influence néfaste sur les propriétés générales et la survie de la spore. Les spores bactériennes sont beaucoup moins sensibles aux agents antiseptiques et aux désinfectants que les formes végétatives correspondantes. Les antibiotiques en particulier peuvent n'être que légèrement **sporostatiques** vis-à-vis d'une espèce alors qu'ils manifestent un pouvoir bactéricide élevé sur les formes végétatives de la même espèce.

2.9.3.3. Durée de survie

Les spores résistent longtemps dans les milieux extérieurs, plusieurs mois à plusieurs années, voire, dans des conditions particulières, plusieurs siècles. On a ainsi pu faire germer des spores trouvées dans la momie de Ramsès II.

2.9.3.4. Synthèse d'antibiotiques

De nombreuses bactéries sporulées sont capables de synthétiser des **antibiotiques**. Tel est le cas de *B. licheneformis* qui produit la bacitracine, de *B. polymyxa* qui élabore la polymyxine, etc. La synthèse de ces substances antibactériennes de même que celle d'autres produits d'excrétion, comme les protéases et les ribonucléases, se situent en fin de phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire au moment de l'engagement irréversible du phénomène de sporulation. Les mutants asporogènes précoces perdent en même temps la faculté de synthétiser ces métabolites. Il apparaît donc, à l'évidence, que ces événements sont étroitement associés et sont soumis, au cours de la croissance végétative, au même mécanisme de répression.

B. thuringensis est pathogène pour les lépidoptères (chenilles) ; son pouvoir toxique est dû à un volumineux cristal protéique pyramidal très irrégulier formé au cours de la sporulation et qui reste adhérent à la spore.

Les protéines cristallisées exercent leurs effets sur la chenille en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif. L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir.

2.9.4. Germination

Lorsque la spore est placée dans des conditions favorables de croissance, elle subit une série de transformations progressives et devient finalement une nouvelle cellule végétative. Ce processus, appelé germination T, comprend trois stades.

2.9.4.1. Activation

Même lorsqu'elle est placée dans un environnement idéal propice à la germination (par exemple, milieu riche en éléments nutritifs), la spore, pour germer, doit être activée par un agent capable de léser la tunique sporale afin de lever la **dormance**. Cet agent indispensable au développement du phénomène peut être mécanique (choc, abrasion), physique (chaleur), chimique (acidité, composé à groupe SH libre). L'activation thermique est particulièrement bien connue : le chauffage des spores entre 65 et 95 °C raccourcit le temps de germination. Ce phénomène est mis à profit au cours de la **tyndallisation** (voir chap. V).

2.9.4.2. Initiation

La germination ne débutera ensuite qu'en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs, comme l'alanine et l'adénosine, ou d'ions inorganiques, comme le magnésium, qui pénètrent à travers la tunique endommagée et déclenchent un processus autolytique : le peptidoglycane sporal est détruit en quelques minutes, libérant le dipicolinate de calcium. De nombreux constituants de la spore sont dégradés par des enzymes hydrolytiques. Après l'élimination de la barrière corticale, la spore s'imbibe d'eau, gonfle, devient plus perméable tout en perdant sa réfringence et sa résistance à la chaleur et aux colorants. La plus grande quantité de l'énergie stockée dans l'acide phosphoglycérique est transformée en ATP.

2.9.4.3. Excroissance

L'altération du cortex et des téguments externes fait émerger une nouvelle cellule végétative com-

Copyrighted material

prenant le protoplaste sporal entouré de sa paroi. Survient alors une phase active de biosynthèse et de reprise graduelle de la croissance végétative : la synthèse des protéines augmente progressivement, la paroi sporale devient la paroi cellulaire, la synthèse de l'ADN reprend. La cellule double son volume initial et se libère de la tunique sporale.

2.9.5. Cas particulier : les conidies d'actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, ramifiées, communément rencontrées dans la nature (sol, eau). Très proches des champignons par leur développement mycélien, ils donnent naissance, au cours de leur évolution, à des structures spécialisées, les conidies ou sporanges, qui libèrent des spores. Il ne saurait être question de confondre ces spores, organes essentiels de reproduction, avec les spores bactériennes qui sont des formes de résistance. Elles apparaissent comme de petites sphères d'environ 1,5 µm de diamètre et groupées en chaînettes (*fig. II.58*).

2.10. Bactéries intracellulaires

Certaines bactéries parasitent obligatoirement les cellules pour se développer. C'est pourquoi on a pu, pendant de nombreuses années, les rapprocher des virus. En réalité, ce sont des bactéries vraies qui possèdent en particulier un appareil nucléaire et une paroi. Ces cellules, de petite taille (< 1 µm), ne peuvent être révélées que par des colorations spéciales. Situées dans le cytoplasme de la cellule hôte, elles en respectent le matériel génétique et ne le détournent pas à leur seul profit comme le font les virus. Ces bactéries intracellulaires appartiennent à deux groupes principaux, les rickettsies et les *Chlamydiae*.

2.10.1. Rickettsies

Pendant très longtemps, on les a considérées comme des micro-organismes à part. Parasites intracellulaires obligatoires incapables de se reproduire en dehors de l'animal, de taille nettement inférieure à celle des bactéries (de 300 à 600 nm), immobiles, ils pouvaient difficilement être classés parmi elles. Pour de nombreux microbiologistes, il était séduisant au contraire de les rapprocher des virus.

Il est maintenant abondamment prouvé que les rickettsies sont des bactéries. Elles se présentent sous une forme coccoïde ou bacillaire. Elles possèdent les deux types d'acides nucléiques propres aux bactéries. Elles ont un équipement enzymatique analogue et se reproduisent par scissiparité ; leur paroi enfin, rigide, est de nature bactérienne.

Elles parasitent naturellement certains arthropodes (poux, tiques, puces) sans leur être nuisibles. En revanche, transmises à l'homme par la piqûre de ces hôtes intermédiaires, elles sont alors responsables d'infections mortelles. Les principa-


a


b

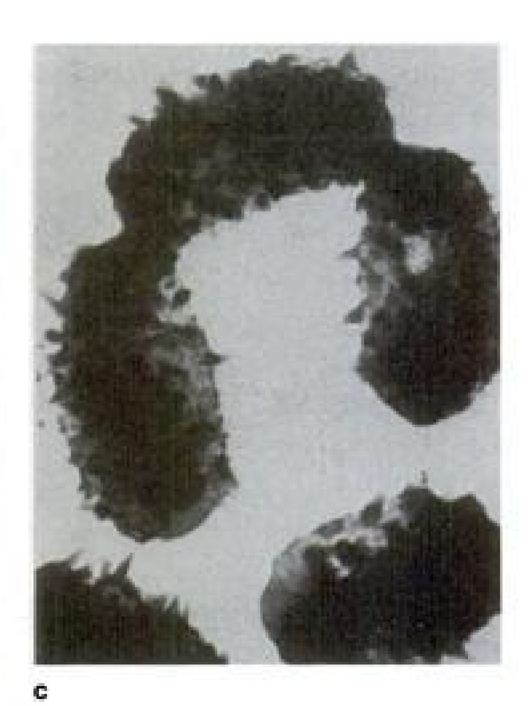

c

Figure II.58 – **Actinomycètes. Spores de streptomyces sp en microscopie électronique.**
(Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de microscopie électronique, Pr. Vivier).
a : spores lisses en chaine, × 10 800 ; b : spores échinulées, × 10 800 ; c : spores échinulées, × 24 300.

Copyrighted material

les rickettsioses sont le typhus épidémique, la fièvre méditerranéenne ou fièvre boutonneuse, la fièvre Q et la fièvre pourpre des montagnes Rocheuses.

2.10.2. *Chlamydiae*

Ces micro-organismes présentent de nombreux points d'analogie avec les rickettsies, mais ils n'infectent que les hôtes vertébrés. Tous possèdent un antigène de groupe, thermostable. Sur la base de leur pouvoir pathogène, on distingue deux groupes principaux.

Le **groupe « ornithose-psittacose »** : l'ornithose et la psittacose sont des broncho-pneumopathies sévères accompagnées de signes généraux importants, pouvant être fatales en l'absence de tout traitement. Elles sont transmises à l'homme par des psittacidés (perroquets) et les pigeons. Les oiseaux qui font des infections inapparentes sont les réservoirs de virus.

Le **groupe « lymphogranulomatose vénérienne-trachome-conjonctivite à inclusions »** : ce sont des infections strictement humaines. La lymphogranulomatose ou maladie de Nicolas-Favre, d'origine vénérienne, se caractérise par des lésions génitales et des adénopathies satellites suppurées. Le trachome est une atteinte oculaire grave de la cornée et de la conjonctive. La conjonctivite à inclusions est au contraire une affection bénigne.

3. Levures et moisissures

Les champignons microscopiques (**mycètes**) se divisent en deux groupes :

– les champignons unicellulaires, ou **levures** ;

– les champignons filamenteux, ou **moisissures**.

3.1. Levures

On appelle levures les champignons microscopiques de type unicellulaire ou présentant dans leur cycle biologique une phase unicellulaire prépondérante.

Les levures non seulement occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire – elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (bière, cidre, vin, fromages) –, mais elles contribuent aussi à la revalorisation des déchets agricoles et industriels et à la production de protéines. Cependant, elles jouent parfois un rôle négatif en contaminant et en dégradant les aliments ; certaines sont pathogènes pour l'homme ou les animaux.

3.1.1. Cytologie et organisation

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires. La cellule, ou **thalle**, a une taille très variable selon les espèces : de 1 à 10 µm de large pour 2-3 ou 20-50 µm de longueur.

La morphologie cellulaire peut être examinée facilement à l'objectif × 40 sur une préparation à l'état frais. Les termes sphérique, globuleux, ovoïde, allongé et cylindrique sont souvent employés pour décrire la forme végétative des levures *(fig. II.59 et II.60)*. Il existe cependant des formes cellulaires caractéristiques : forme en « bouteille » des *Pityrosporum*, forme triangulaire des *Trigonopsis*. Dans certaines conditions de culture, les levures peuvent donner des formes **mycéliennes** (thalles pluricellulaires).

3.1.2. Paroi

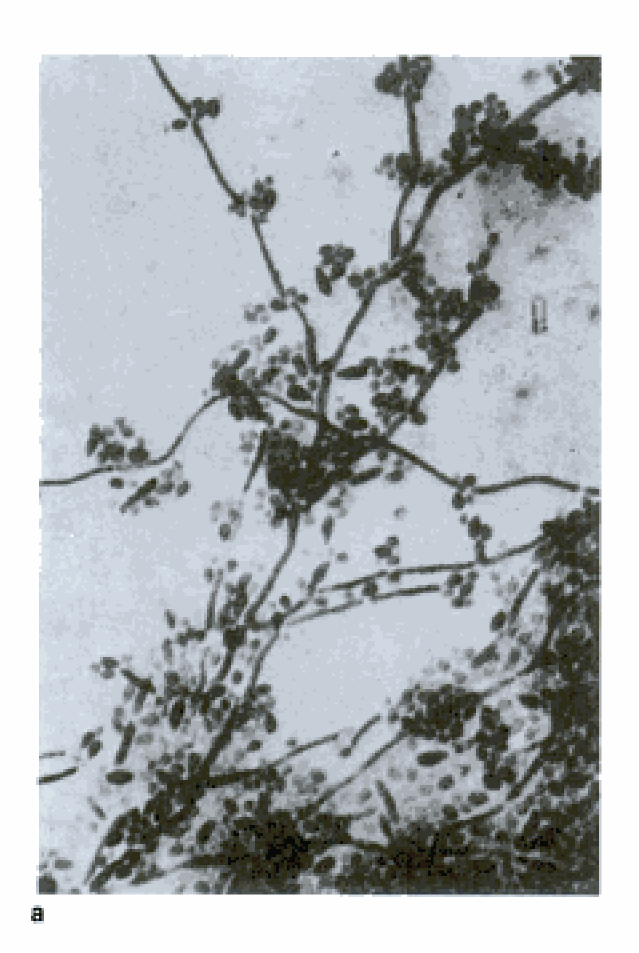
La cellule de levure est limitée par une paroi rigide qui représente près de 20 % de son poids sec. Son épaisseur varie de 150 à 230 nm. Par sa rigidité, elle donne à la cellule sa forme caractéristique. Elle est constituée à 80 % de polysaccharides antigéniques (mannanes, glucanes et chitine sont les représentants les plus importants) et de protéines (de 10 à 20 %), dont près de la moitié sont des mannoprotéines. Elle est formée de trois couches *(fig. II.61)* :

– la couche interne, de β(1-3)-glucane, insoluble en milieu alcalin, de structure fibrillaire, assure le maintien et la rigidité de la paroi ;

– la couche moyenne, de β(1-3)-glucane soluble ramifié qui confère une certaine élasticité à la paroi, est aussi le lieu d'ancrage des mannoprotéines ;

– la couche externe, de mannanes phosphorylés ;

Copyrighted material



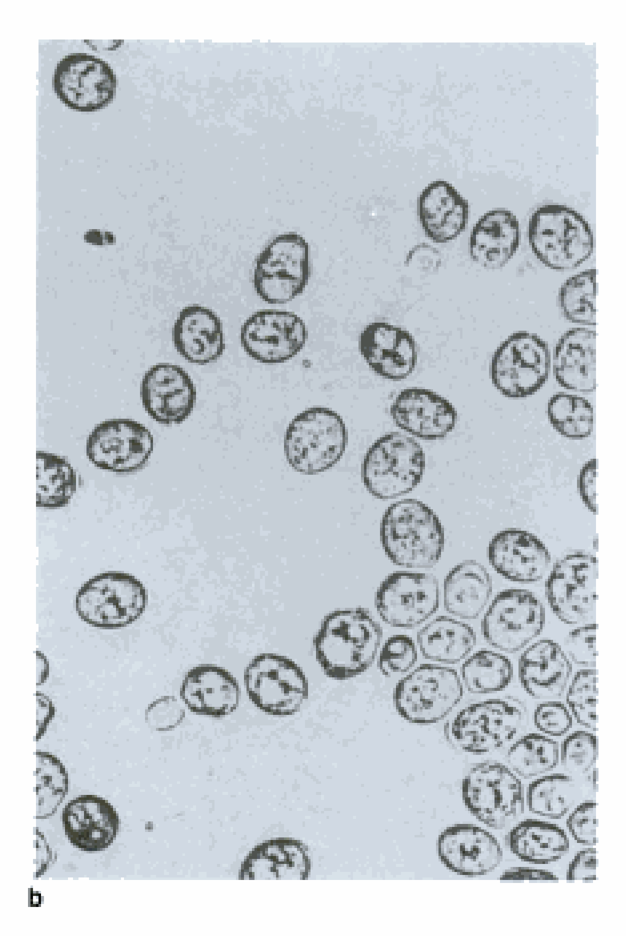


Figure II.59 – Levures.
(Laboratoire de Cryptogamie, Université des Sciences et Techniques de Lille).
a : *Candida albicans* ; b : *Saccharomyces cerevisiae.*

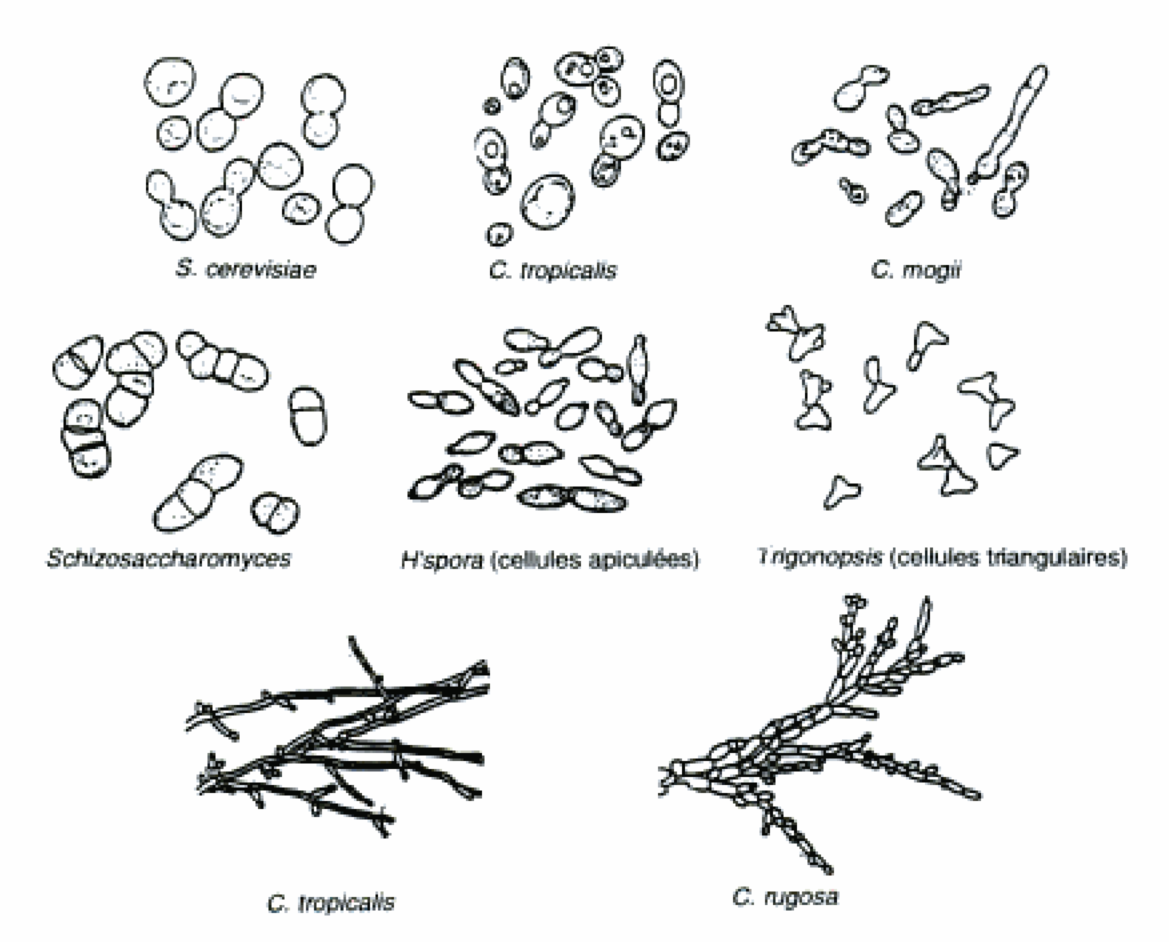


Figure II.60 – Morphologie des levures. Thalles unicellulaires et mycélium.

Copyrighted material

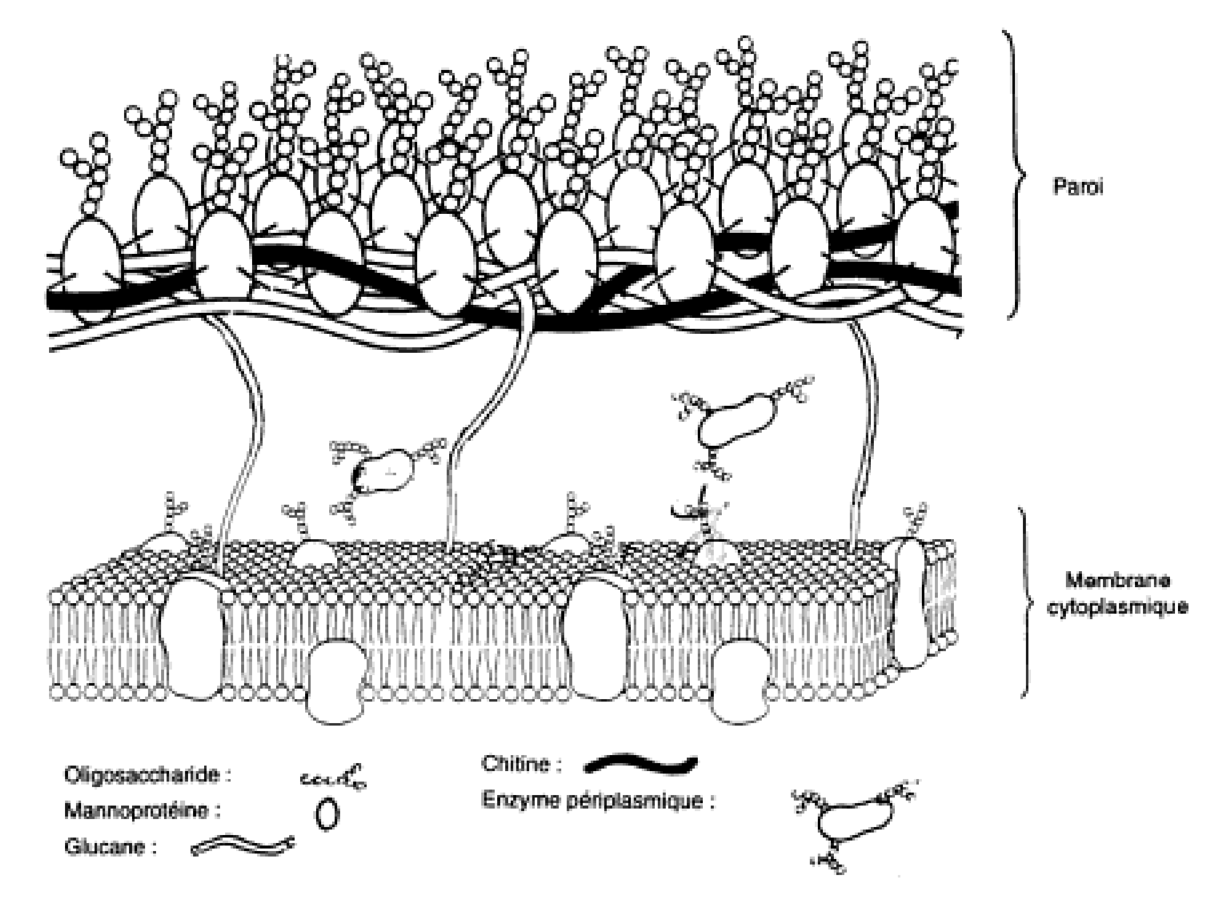


Figure II.61 – **Structure membranaire des levures.**

Du β(1-6)-glucane assure le lien entre les différentes couches.

La chitine *(fig. II.62)* est localisée au niveau de la zone de cicatrisation lors du bourgeonnement ; elle permet ainsi le maintien de l'intégrité de la paroi et, donc, la survie des cellules. Elle est séparée de le membrane cytoplasmique par un espace périplasmique où sont localisées des enzymes : invertase, phosphatase acide, β-glucosidase, β-glucanases de type β(1-3) et β(1-6) (ce dernier étant impliqué dans le renouvellement de la paroi au cours de la croissance et du bourgeonnement), de protéases, etc.

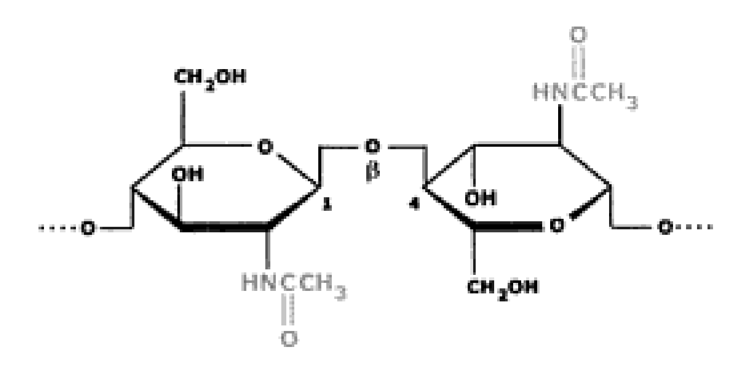


Figure II.62 – **Structure de la chitine.**

3.1.3. Membrane cytoplasmique

La membrane cellulaire est riche en stérols (ergostérol et zymostérol). Elle est également constituée de protéines et de phospholipides. Elle se compose de trois feuillets : un feuillet médian constitué de lipides et de phospholipides, les deux autres étant constitués de protéines. Ils sont impliqués dans le transfert de substances et dans les activités enzymatiques

3.1.4. Cytoplasme

Hydrogel au pH voisin de 5, le cytoplasme contient de nombreuses enzymes, notamment celles de la glycolyse et de la fermentation alcoolique, du glycogène et des organites équivalents à ceux des cellules eucaryotes. On retiendra essentiellement :

- les ribosomes ;
- le réticulum endoplasmique ;
- les mitochondries (environ 50 par cellules).

Contenant leurs propres ADN et ARN, elles contrôlent la résistance à certains antiseptiques et la synthèse des enzymes respiratoires. Leur étude génétique précise permet maintenant le marquage

Copyrighted material

génétique des souches sélectionnées, apport essentiel en œnologie. Elles dégénèrent en conditions anaérobies ;

– la vacuole, organite entouré d'une seule membrane, contenant de nombreuses enzymes (ARNases, protéases, notamment la protéase A intervenant au cours de l'autolyse du protoplaste de levure lors de la conservation sur lies des vins).

Par ailleurs, le cytoplasme héberge aussi de petites vacuoles de substances de réserve (tréhalose qui peut constituer jusqu'à 16 % du poids sec des cellules, glycogène qui peut en constituer jusqu'à 12 %, acides aminés libres, polyphosphates, lipides qui peuvent atteindre jusqu'à 50 % du poids sec en conditions limitatives en azote).

3.1.5. Noyau

Très petit, le noyau est en général unique.

Chez *Sc. cereviseae,* on a pu y dénombrer 17 chromosomes et identifier 200 gènes. La structure de ces chromosomes est semblable à celle des autres eucaryotes avec un enroulement de l'ADN en « grains de chapelet » formés par des nucléosomes constitués d'histones de type H_2A, H_2B, H_3 et H_4. La membrane nucléaire persiste au cours de la division (voir chap. III).

Un plasmide de 2 µm est présent chez presque toutes les souches de *Sc. cereviseae,* et ceci à 60 copies environ.

3.2. Moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux **hétérotrophes** : certains vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres encore sont des saprophytes qui se développent sur des déchets organiques ou contaminent les produits alimentaires.

Ils sont souvent dotés de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques…) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes). L'intervention des champignons filamenteux dans les industries alimentaires se situe à plusieurs niveaux. Il y a les champignons à activité phytopathogène qui sont très néfastes pour la production des matières alimentaires brutes que sont les fruits et les légumes. Les moisissures saprophytes contaminent les aliments et les dégradent au point de vue qualitatif. Certains de ces champignons sont **toxinogènes** et libèrent dans l'aliment des mycotoxines qui sont très dangereuses du point de vue sanitaire.

Les champignons filamenteux sont parfois aussi très utiles et largement utilisés dans l'agriculture (pourriture « noble » des raisins du sauternes par *Botrytis*) ou dans l'industrie : produits laitiers (fromages), productions de molécules à activité pharmacologique (antibiotiques), d'enzymes industrielles (voir chap. III).

3.2.1. Cytologie

Les champignons filamenteux sont des **eucaryotes** non photosynthétiques et immobiles. Ils sont multicellulaires mais la notion de cellule est assez floue car leur structure est souvent mycélienne et **cœnocytique** (cellules fusionnées à plusieurs noyaux). La paroi cellulaire responsable de la forme est riche en **cellulose** ou en **chitine** selon les groupes (cellulose chez les myxomycètes, *Saprolegniales* et *Peronosporales,* chitine chez les *Mucorales, Ascomycetes* et *Basidiomycetes*). Elle contient également, en proportions variables, des substances mucilagineuses, des polysaccharides, des substances pectiques, des protéines, des pigments, de l'hémicellulose.

Le cytoplasme, limité par une membrane cytoplasmique, contient des ribosomes, des mitochondries, un ergastoplasme, des vacuoles et un ou plusieurs noyaux. Les vacuoles forment un réseau dans le mycélium jeune et une grande zone centrale dans le mycélium âgé. Les réserves prennent la forme de tréhalose et de glycogène. Il existe également des inclusions lipidiques avec des lipochromes solubles ; on trouve aussi parfois des tannins et des cristaux d'oxalate de calcium. Les noyaux sont de petite taille ; ils sont limités par une membrane nucléaire et contiennent plusieurs chromosomes.

3.2.2. Organisation fongique

L'élément structural de base est l'**hyphe**. Ramifiés entre eux, plusieurs hyphes forment le mycélium ou thalle pluricellulaire *(fig. II.63 et II.64).*

Copyrighted material

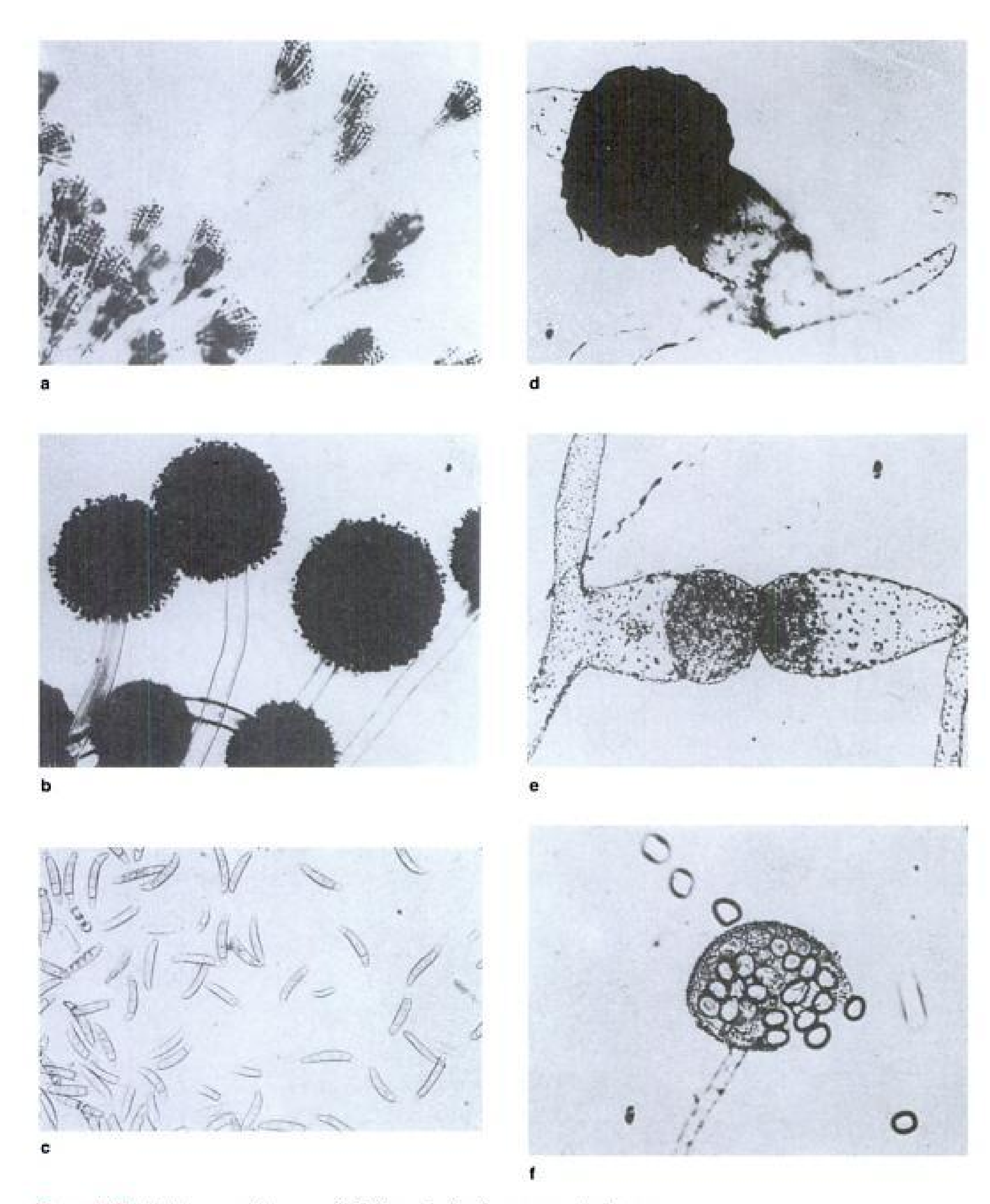


Figure II.63 – Moisissures : formes végétatives et structures reproductrices.
(Laboratoire de Cryptogamie, Université des Sciences et Techniques de Lille).

a : *Penicillium expansum* ; conidiophores, × 23 ;
b : *Aspergillus sp* ; conidiophores, × 23 ;
c : *Fusarium sp* ; × 23 ;
d : zygospores, × 23 ;
e : gamétocystes, × 23 ;
f : sporocystes, × 40.

Copyrighted material

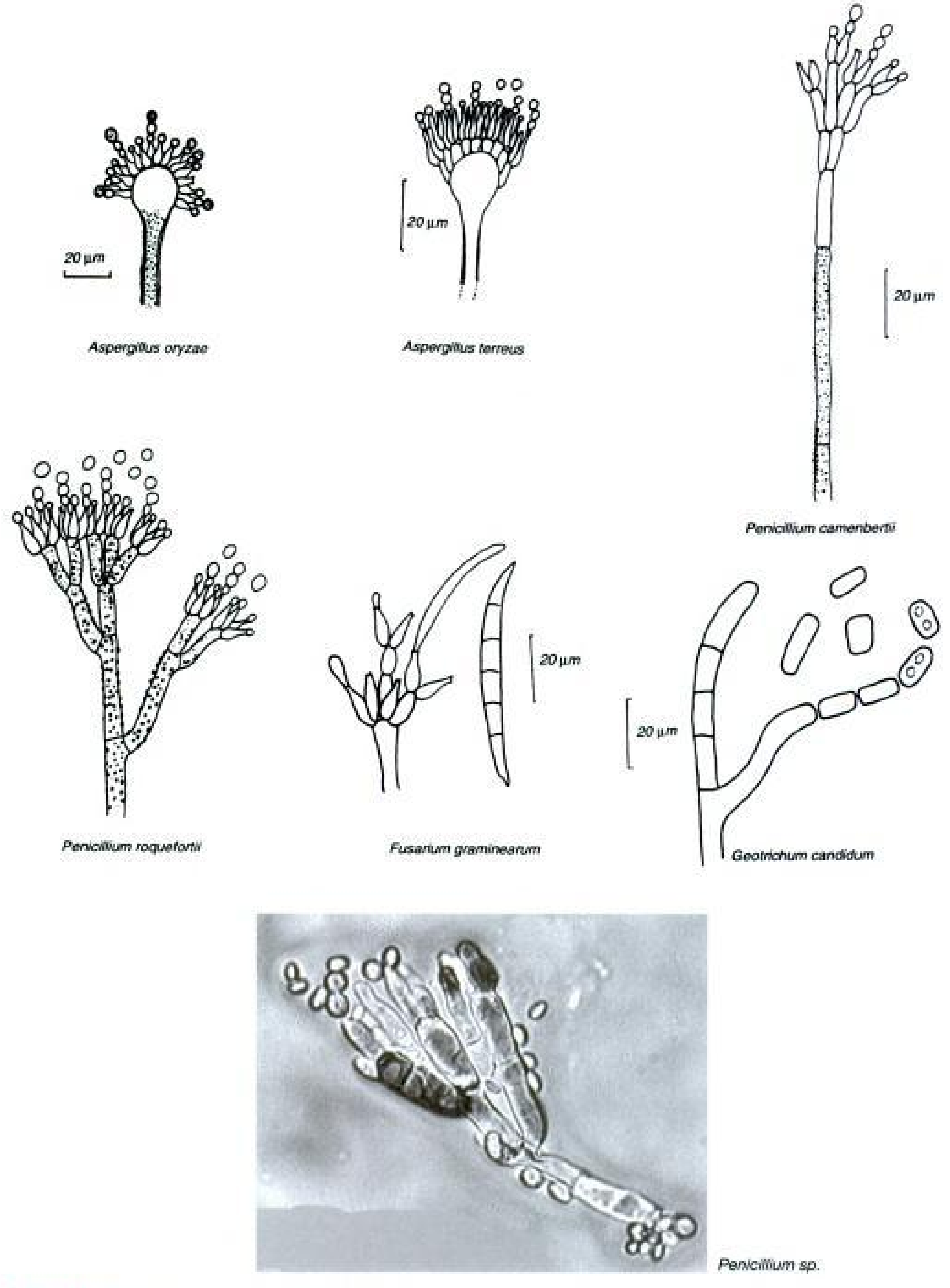


Figure II.64 – **Morphologie de quelques moisissures.**
(Avec l'aimable autorisation de M. Kriat Marseille).

Copyrighted material

Certaines espèces se développent sous forme de thalles mobiles (myxomycètes) ou unicellulaires (chytridiales). Les thalles sont cloisonnés (cellules bien séparées) ou siphonnés (sans séparation entre les cellules : **cœnocytiques**). Il existe aussi des thalles septés, où les séparations entre les cellules laissent place aux communications, à l'instar des plasmodesmes végétaux.

Des structures fructifères et reproductrices servent à la multiplication et à la dissémination de l'espèce : elles sont d'origine végétative ou sexuelle (voir chap. III).

4. Classification des micro-organismes

La liste des micro-organismes s'est enrichie d'année en année et, pour l'utiliser rationnellement, il est apparu impératif de leur attribuer un nom (nomenclature) et de les classer. La **nomenclature** est l'ensemble des règles qui permettent de définir et de choisir les noms. La **classification** est la méthode qui permet de séparer les objets et de les réunir en groupes apparentés sur la base de critères définis. Lorsqu'il s'agit d'organismes ou de micro-organismes, on parle de **taxonomie** ou de **taxinomie** (du grec *taxis* : arrangement).

Toute unité étudiée et décrite qui s'inscrit dans la classification peut être reconnue et identifiée. L'identification d'une souche bactérienne consiste à comparer ses caractères avec ceux des modèles figurant dans la classification.

La classification des micro-organismes ou protistes s'inspire tout naturellement des lois qui régissent celles des animaux et des végétaux. Elle est donc conçue et copiée selon les principes établis par Linné. Le premier de ces principes veut que tout individu appartienne à une espèce, toute espèce à un genre, etc. C'est l'espèce qui est à la base de la construction.

4.1. Classification bactérienne

4.1.1. Unité taxonomique

L'espèce telle qu'elle est définie chez les organismes supérieurs, plantes ou animaux, repose sur l'interfécondité des individus d'une même espèce. Cette notion d'espèce biologique, fondée sur la sexualité, est aussi liée à la notion de groupe, de population occupant une région géographique déterminée, lieu de rencontre nécessaire où les membres de l'espèce pourront se reproduire et transmettre à leurs descendants leur patrimoine héréditaire. Les informations recueillies pour construire cette classification sont multiples. Elles sont par essence d'ordre **phylogénétique** car elles ont pour but de grouper les organismes de la façon qui exprime le mieux leur degré de parenté au cours de l'évolution. Ces classifications **phylogénétiques** ou **naturelles** s'appuient sur des critères liés à la structure génétique des organismes : anatomie comparée, physiologie, paléontologie.

Il ne peut en être ainsi avec les bactéries, chez qui la reproduction est asexuée (sauf exception). La définition de l'unité taxonomique élémentaire a été esquissée dès les débuts de la bactériologie par une approche purement descriptive qui est encore en usage actuellement. Il s'agit, par exemple, du biotype que Lwoff définit comme « un groupe d'individus possédant essentiellement le même patrimoine héréditaire et ayant nécessairement en commun la grande majorité de leurs caractères ». Le biotype dérive du **clone**, c'est-à-dire de la population bactérienne issue d'une seule et même cellule parentale par division asexuée. L'unité taxonomique repose donc, ici, sur un ensemble de caractères phénotypique artificiellement rassemblés.

L'étude globale des phénotypes et de leurs ressemblances, même poussée à son plus haut degré de perfection grâce aux nouvelles méthodes, ne donne pourtant qu'une information tronquée et imparfaite (quelques centaines de caractères) car elle ne traduit qu'une faible partie du génotype, le génome bactérien, comme celui d'*E. coli*, contenant plus de 3 000 gènes. C'est sans doute la raison pour laquelle l'approche génétique a connu au

Copyrighted material

cours de ces dernières années un succès total. Elle concerne la nature physico-chimique du génome.

Plusieurs paramètres sont maintenant utilisés pour évaluer les parentés génétiques des bactéries. Ce sont : (1) le contenu en guanine + cytosine de l'ADN (GC % ou **coefficient de Chargaff**) ; (2) la taille du génome ; (3) l'hybridation ADN/ADN dans des conditions de température optimale ; (4) la stabilité thermique des hybrides ; (5) l'hybridation ADN/ADN aux conditions de température restrictive.

1) Le contenu en G + C de l'ADN des bactéries varie selon les espèces de 25 à 75 %. Il est spécifique d'une espèce donnée, plusieurs espèces pouvant avoir le même GC %. L'information GC % est utile et nécessaire mais sa valeur de discrimination est faible.

2) La taille du génome, c'est-à-dire la masse molaire de l'ADN d'une bactérie, est situé entre 1 et 8×10^9. Cette mesure peut présenter de l'intérêt dans certains cas. Elle a été utilisée, par exemple pour différencier *Legionella pneumophila* (3×10^9 d) d'une espèce proche, *Rochalimaea quintana* (1×10^9 d).

3) L'homologie ou la parenté génétique ADN/ADN est évaluée par réassociation ou hybridation de l'ADN monobrin d'une souche avec l'ADN monobrin d'une autre souche. Cette réassociation est une réaction spécifique, étroitement dépendante des conditions physico-chimiques de l'expérience, en particulier de la température. La température optimale d'hybridation, dite encore de **renaturation** (Tor), est de 25 à 30 °C inférieure à celle de dénaturation, soit environ 60 °C. Les études portant sur un très grand nombre de groupes de bactéries indiquent que l'espèce bactérienne est composée de souches qui ont entre elles une homologie de 70 à 100 %. Les souches qui appartiennent à des espèces différentes ont une homologie comprise entre 0 et 60 %.

4) La stabilité thermique des hybrides est mesurée en étudiant leur cinétique de dénaturation lorsqu'on élève progressivement la température de la solution au-dessus de la température optimale (Tor). On appelle Tm(e) (*thermal elution midpoint*), ou température de dénaturation 50 % de l'hybride, la température à laquelle 50 % de la radioactivité peut être éluée du duplex. La Tm(e), ou différence de stabilité thermique des hybrides, est directement en rapport avec le pourcentage de paires de bases non appariées : la correspondance est d'environ 1 % de bases non appariées pour une Tm(e) de 1 °C. En pratique, on considère que les souches appartenant à la même espèce doivent avoir une Tm(e) compris entre 1 et 5 °C, c'est-à-dire que le pourcentage de bases non appariées des hybrides ne doit pas dépasser 5 % environ ; les souches provenant d'espèces différentes auraient une Tm(e) située entre 8 et 20 °C.

5) L'homologie ou la parenté génétique ADN/ADN peut être mesurée, non pas comme en (3), à la température optimale de réassociation (60 °C), mais à une température qui ne facilite pas les hybridations et qu'on appelle température restrictive de renaturation ou Trr (*stringent temperature*). Elle est de 10 à 14 °C inférieure à la température de dénaturation (75 °C pour les *Enterobacteriaceae*). Les souches appartenant à une même espèce ont une homologie à la température restrictive de 55 à 100 %. Celles qui appartiennent à des espèces différentes ont une homologie égale ou inférieure à 50 %. Cette approche est particulièrement utile pour étudier des souches qui ont, entre elles, des homologies de 60 à 70 % à la température optimale de renaturation.

L'application de ces cinq paramètres conduit à une définition « génétique » de l'espèce. Ainsi, l'espèce *E. coli* comprend les souches qui ont un contenu en G + C de 49 à 52 %, une taille du génome de 2,3 à 3×10^9 daltons, une homologie de 70 % ou plus à la température optimale de renaturation, une Tm(e) égale ou inférieure à 5 °C et une homologie de 55 % ou plus à la température restrictive de renaturation. Plus simplement, on pourrait tendre à définir l'espèce à l'aide des deux paramètres les plus importants, à savoir l'homologie génétique à la température optimale de renaturation et la Tm(e) ou différence de stabilité des hybrides. Les autres paramètres pourraient être explorés dans les cas litigieux ou dans des circonstances particulières. Ainsi, l'espèce serait définie comme un ensemble de souches ayant entre elles une homologie de 70 % ou plus à la température optimale de renaturation et une Tm(e) égale ou inférieure à 5 °C. Cette définition n'est pas sujette aux variations phénotypiques, aux mutations, à la présence ou à l'absence de plasmides métaboliques.

L'approche moderne de la taxonomie bactérienne pourrait être polyphasique. La première étape serait phénotypique (taxonomie numérique) pour rassembler des souches en groupes de similitudes, ou phénons, ayant en commun la majorité de leurs caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques…).

Au cours de la deuxième étape, l'hybridation ADN/ADN permet de rechercher si la parenté T phénotypique est confirmée par une homologie génétique.

Enfin la troisième étape, la plus importante pour l'identification, consiste à sélectionner parmi tous les caractères phénotypiques testés au cours de la première étape (souvent, de 200 à 300 caractères) quelques-uns d'entre eux seulement (de 20 à 30) qui seront les plus performants pour la reconnaissance de l'espèce. L'espèce ainsi conçue est à la base de la classification, ce qui semble actuellement très largement admis et présente la même signification pour chacun. Plusieurs espèces peuvent constituer un genre, plu-

Copyrighted material

sieurs genres une famille, plusieurs familles une classe et plusieurs classes une division *(tab. II.5)*. À l'intérieur de l'espèce, on reconnaît, au niveau intraspécifique, les **biotypes** (marqueurs biochimiques), les **sérotypes** (marqueurs antigéniques), les **lysotypes** (sensibilité aux phages), les **génotypes**, les **pathotypes** et les **toxotypes** (facteurs de pathogénicité).

4.1.2. Caractères phénotypiques : taxonomie phénotypique

Les caractères anatomiques ou physiologiques, habituellement mis en évidence par des tests simples et pratiques, sont variés. Quelques-uns seront énumérés à titre d'exemples :

– aspects morphologiques : forme sphérique, en bâtonnet ou hélicoïdale, dimensions de la cellule, flagelle, capsule, spore ;

– aspect structural : mucopeptide de paroi, constituants pariétaux, etc. ;

– aspects tinctoriaux : coloration de Gram, de Ziehl-Nielsen, etc. ;

– types trophiques : phototrophie ou chimiotrophie, lithotrophie, organotrophie, autotrophie, hétérotrophie, prototrophie, auxotrophie, aérobie, anaérobie, etc. ;

– métabolisme : action sur les glucides, les protides, les lipides ; production d'indole, d'acétoïne, etc. La physiologie bactérienne comparée a comme finalité d'exploiter la diversité métabolique que les bactéries ont développée au cours de leur évolution. L'étude du métabolisme en particulier glucidique (caractérisation des types de transports et des voies) chez quelques représentants de la branche gamma des protéobactéries *(Enterobacteriaceae, Plesiomonas, Pasteurella, Aeromonas)* par des méthodes physico-chimiques (chromatographie, enzymologie, spectroscopie RMN du ^{13}C et ^{31}P) a montré des particularités métaboliques étonnantes telles que l'accumulation suicide de substrats, la production de métabolites ou la présence de systèmes de transport très différents des originaux. Ces recherches se poursuivent *(Vibrionaceae, Haemophilus, Actinobacillus, Pseudomonadaceae)* ;

Tableau II.5 – Catégories et rangs taxonomiques.

Catégorie	Équivalent latin, abréviation	Exemple (*Pseudomonas syringae*)
Domaine ou empire	*Regio* ou *Imperium*	*Bacteria* ou *Eubacteria*
Règne	Regnum	*Bacteria*
Division ou phylum	*Divisio* ou *phylum*	*Gracilicutes*
Classe	*Classis* : class.	*Proteobacteria*
Sous-classe	*Subclassis* : subclass.	Gamma
Ordre	*Ordo* : ord.	*Pseudomonadales*
Sous-ordre	*Subordo* : subord.	*Pseudomonadineae*
Famille	*Familia* : fam.	*Pseudomonadaceae*
Sous-famille	*Subfamilia* : subfam.	
Tribu	*Tribus*	*Pseudomonadeae*
Sous-tribu	*Subtribus*	
Genre	*Genus* : gen.	*Pseudomonas*
Sous-genre	*Subgenus* : subgen.	
Espèce	*Species* : sp.	*Pseudomonas syringae*
Sous-espèce	*Subspecies* : subsp.	*Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*
Biovar, sérovar, pathovar.	bv, sv, pv	pv. *Tomato*

Copyrighted material

– sensibilité ou résistance aux agents antimicrobiens, en particulier aux antibiotiques.

Pour construire une classification à l'aide de ces caractères, on est amené à donner arbitrairement un poids à certains d'entre eux, à établir des dominances et des hiérarchies permettant de séparer les groupes les uns des autres. La conception subjective de cet édifice est éminemment critiquable. Pour s'y soustraire, certains proposent d'affecter à tous les caractères la même valeur, le même poids. Cette idée, émise en 1763 par le botaniste français Adanson, a été remise en vogue et appliquée aux bactéries par Sneath (1957). C'est la **classification adansonnienne** encore appelée **taxonomie numérique**.

4.1.2.1. *Souches et caractères : choix et codage*

Une étude de taxonomie numérique doit contenir une bonne sélection de souches sauvages en même temps que les souches types du taxon considéré et des taxons apparentés. Des souches provenant de différentes parties du monde seront également incluses, si possible.

Les caractères sont analysés en grand nombre (au moins 60 et, au mieux, environ 100). L'image du génotype ne pourra être rendue que par un échantillon diversifié d'informations phénétiques, morphologiques, physiologiques, biochimiques, prises au hasard. On élimine naturellement les caractères non significatifs, c'est-à-dire ceux qui sont toujours positifs ou toujours négatifs, de même que les caractères redondants (par exemple, mobilité en gélose et mobilité entre lame et lamelle) ou interdépendants (par exemple, mobilité et présence de cils).

Pour être comparés, ces caractères doivent être au préalable codés. Ce codage dépend de la nature du caractère selon qu'il est qualitatif ou quantitatif, en même temps que de sa valeur d'information génétique. Est qualitatif un caractère à deux modalités contradictoires, à savoir présence ou absence, traduites dans les résultats en + ou – et, dans l'analyse automatique, par le code binaire : 1 (présence du caractère), 0 (absence du caractère). Si l'absence du caractère est considérée comme aussi importante que sa présence, les deux possibilités sont proposées.

4.1.2.2. *Mesure d'affinité entre les souches*

Elle s'exprime généralement par l'indice de ressemblance, soit de similitude, soit de distance. Il existe un grand nombre de formulations pour l'indice de similitude. Parmi ceux qui sont le plus couramment utilisés, on peut citer **l'indice de Jaccard** :

$$S_{AB} = nS^+/(nS^+ + nd)$$

avec S_{AB} : coefficient de similitude entre les souches A et B, nS^+ : nombre de caractères semblables et nd : nombre de caractères différents.

L'indice Jaccard est le **coefficient de similitude** utilisé dans la méthode de référence de Sneath. Seules interviennent ici les similitudes entre caractères positifs, les caractères négatifs n'étant pas pris en considération dans le calcul. Il est possible de remplacer le calcul du coefficient de similitude par la mesure de la distance taxonomique. On se réfère habituellement à l'**indice de pseudo-distance** d = 1 – S ; il sera d'autant plus petit que la valeur de l'indice de similitude sera plus grande.

Le choix d'un indice de ressemblance est directement lié au codage des caractères. Si l'on souhaite recueillir certaines des similitudes négatives, il convient alors de s'adresser à un indice type Jaccard. La calculatrice ne prendra en compte que les chiffres 1 dans les deux termes de l'alternative du code binaire 01 ou 10.

4.1.2.3. *Méthodes de classification et représentation graphique*

Les méthodes de classification opèrent par division ou par agglomération. Dans le premier cas, on aboutit à une dichotomie simplifiée peu représentative lorsqu'il s'agit d'une classification d'organismes vivants. Dans le second cas, on regroupe les individus sur la base de leurs affinités en se référant à l'indice de ressemblance (similitude ou distance). La méthode conduit à définir des groupes, ou taxons, polythétiques, c'est-à-dire construits à l'aide de caractères nombreux et partagés de façon plus ou moins complète. Elle hiérarchise ces groupements par des niveaux de ressemblance. Ainsi, aux premiers niveaux hiérarchiques sont formés des groupes d'organismes très semblables aux niveaux suivants, les réunions des groupes correspondent à des ressemblances moins grandes ; au niveau hiérarchique le plus élevé, tous les individus sont réunis dans un seul groupe

Les **groupes taxonomiques** encore appelés **phénons** (caractères phénotypiques), peuvent être représentés graphiquement. D'après la méthode de référence de Sneath, les coefficients de similitude sont reportés sur une matrice à double entrée et réordonnés de manière à faire apparaître les phénons le long de la diagonale de la matrice *(fig. II.65)*. Actuellement, les résultats sont présentés sous forme de dendrogrammes permettant de visualiser rapidement la structure hiérarchique. Le **dendrogramme** est figuré par un arbre à plusieurs branches et rameaux représentant les souches. Les pourcentages de similitude permettent de couper cet arbre en des niveaux choisis, calculés mathématiquement, donnant ainsi naissance à des phénons.

4.1.3. Caractères génétiques : taxonomie génétique

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse. Trois critères sont classiquement recherchés :

Copyrighted material

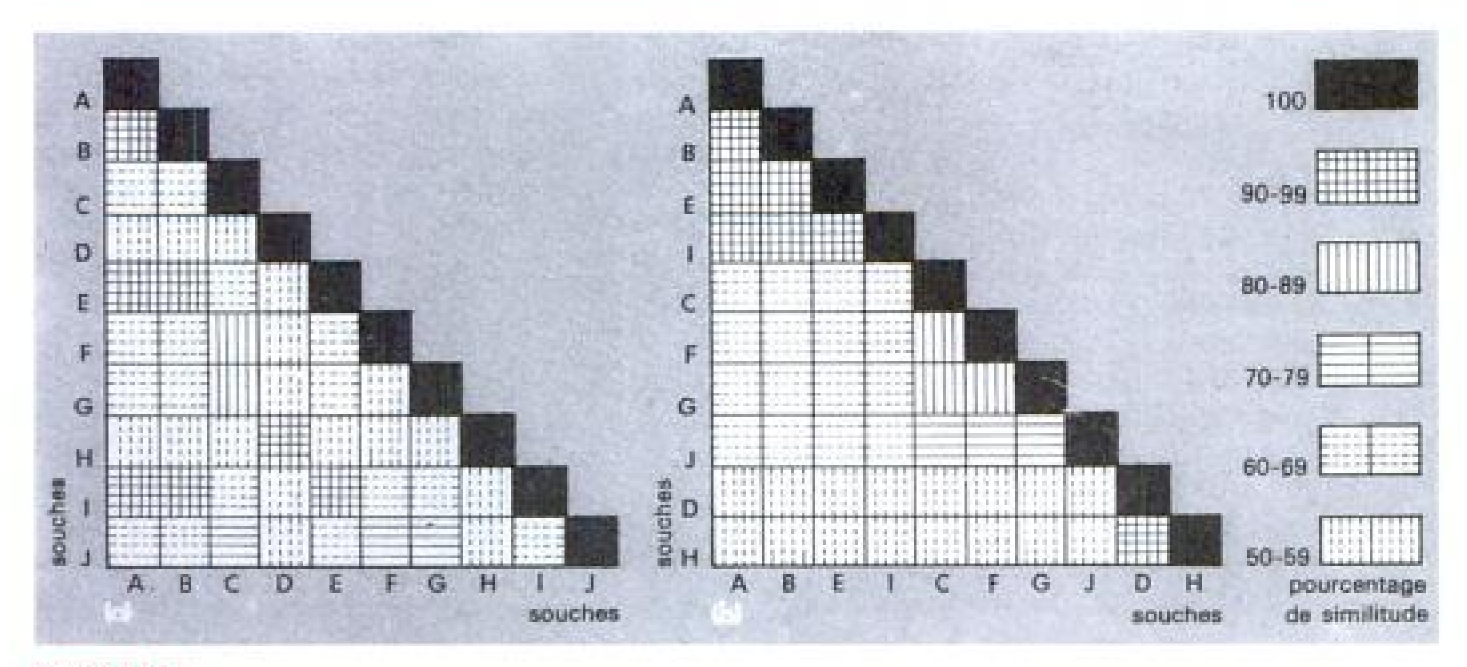


Figure II.65 –

a : diagramme schématique représentant une matrice de similitude entre des souches A B C D E prises deux par deux ;
b : réarrangement des coefficients de similitude aboutissant à la formation de groupes ou phénons
(D'après P.H.A. SNEATH. La construction des groupes taxonomiques in Microbial Classification. G.C. Gainsworth, P.H.A. SNEATH, éd., New York : Cambridge University Press, 1962).

- le GC % ou coefficient de Chargaff ;
- le taux d'hybridation ADN/ADN ;
- la séquence des ARN ribosomaux 16S et 5S.

4.1.3.1. Coefficient de Chargaff

L'ADN natif est caractérisé par son **hypochromicité** due à l'arrangement régulier et parallèle des paires de bases le long de la double hélice ; chaque paire de base, en effet, constitue un dipôle qui absorbe faiblement la lumière à 260 nm (UV). Lorsque l'ADN natif est soumis à un agent dénaturant comme la chaleur, la double hélice se sépare à la suite de la destruction des liaisons hydrogènes entre les bases. Cette modification structurale se traduit par une augmentation de l'absorption UV qu'on appelle effet hyperchromique et qui peut atteindre jusqu'à 40 %. La température de transition ou Tm (de l'anglais : *temperature melting*) est celle qui correspond à une augmentation de l'absorbance atteignant 50 % de l'absorbance maximale. On l'appelle plus communément, pour cette raison, la température moyenne de transition. La Tm est rigoureusement fonction du taux respectif des bases, car les triples liaisons hydrogènes des paires GC exigent pour leur rupture une température supérieure à celle de la séparation des doubles liaisons des bases AT.

Cette relation est mise à profit, en particulier, dans la détermination du GC % ou coefficient de Chargaff. Cet auteur a en effet montré que s'il existe une équivalence entre les taux de bases puriques et pyrimidiques de tous les ADN, en revanche le rapport A + T/C + C, exprimé plus communément par le GC % (nombre de couples guanine + cytosine pour 100 couples de bases dans le duplex d'ADN), varie selon l'espèce. La technique mise en œuvre par Chargaff associe la séparation chromatographique des bases puriques et pyrimidiques et leur évaluation quantitative en spectrophotométrie UV. Les données accumulées avec une grande variété de micro-organismes se sont révélées précieuses pour la reconnaissance de l'espèce.

Le GC % est une information de grand intérêt en taxonomie, mais qui comporte des limites que l'on pourrait résumer de la façon suivante :

- deux espèces microbiennes ayant des coefficients de Chargaff très différents n'ont pas de communauté génétique entre elles ;
- deux bactéries qui possèdent les mêmes séquences nucléotidiques sur leur génome ont nécessairement le même contenu G + C dans leur ADN ;
- à l'inverse, deux bactéries qui ont un pourcentage G + C identique ne présentent pas obligatoirement les mêmes séquences nucléotidiques. Elles peuvent être génétiquement très éloignées l'une de l'autre ;
- les bactéries appartenant à une même espèce doivent avoir le même coefficient de Chargaff.

4.1.3.2. Hybridation ADN/ADN

La renaturation *in vitro* de deux brins d'ADN hétérologues conduit à la formation d'un hétéroduplex dans lequel il est possible de définir le degré d'homologie, c'est-à-dire le pourcentage de séquences complémentaires par rapport aux séquences totales. En dehors de leur intérêt fondamental, les techniques d'hybridation, d'application courante, vont conduire à un bouleversement considérable de la classification bactérienne. Compte tenu de leur importance, plusieurs méthodes seront décrites dans leurs principes.

Copyrighted material

4.1.3.2.1. *Hybridation sur filtre de nitrocellulose (Deley et Tijtgat, 1970)*

On dispose des réactifs suivants : ADN « A » froid dénaturé (monobrin) non fragmenté et immobilisé sur un filtre de nitrocellulose ; ADN radioactif, dénaturé et fragmenté ; ADN « B », froid, dénaturé et fragmenté. L'hybridation *in vitro* fait intervenir un phénomène de compétition entre l'ADN et l'ADN « B », vis-à-vis de l'ADN « A » fixé au filtre.

4.1.3.2.2. *Technique à l'hydroxyapatite (Brenner, 1969)*

L'hydroxyapatite est un gel de phosphate de calcium de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ dont les propriétés sont mises à profit dans l'analyse de l'ADN. Il permet en effet l'absorption des ADN monocaténaires ou bicaténaires puis leur élution différentielle. Les solutions d'ADN de référence et d'ADN radioactif dénaturés sont mélangées et incubées dans des conditions convenables de concentration, de température (en général 60 °C) et de force ionique. Elles sont ensuite passées sur une colonne d'hydroxyapatite. En comparant les quantités de radioactivité éluées respectivement avec les tampons 0,14 M et 0,3 M, on peut calculer le pourcentage d'hybridation.

4.1.3.2.3. *Technique à l'endonucléase (Crosa, 1973)*

Les solutions de deux ADN sont incubées en vue de la formation de l'hybride. On fait agir ensuite une endonucléase qui dégrade spécifiquement l'ADN monocaténaire, c'est-à-dire non apparié. L'ADN bicaténaire, résistant à l'enzyme, est précipité par l'acide trichloracétique puis recueilli sur un filtre dont on détermine la radioactivité après séchage. Le pourcentage d'ADN précipité par l'acide trichloracétique correspond au pourcentage de réassociation.

4.1.3.2.4. *Technique optique (Deley, Cattoir et Reynaerts, 1970)*

Elle consiste à mesurer la vitesse de renaturation des deux ADN étudiés pris séparément et celle de leur mélange. Le pourcentage d'hybridation peut être déduit de la mesure des vitesses de renaturation par une formule mathématique appropriée. La méthode présente un double avantage : d'une part, les résultats sont acquis au bout d'un temps très bref (de 30 à 40 minutes) ; d'autre part, la préparation d'ADN radioactif de référence n'est pas nécessaire. Cependant, elle ne permet d'étudier qu'un seul échantillon par expérience.

4.1.3.2.5. *Apport des techniques d'hybridation à la taxonomie bactérienne*

L'hybridation ADN/ADN apparaît comme une mesure indispensable de l'analyse taxonomique. Deux autres données doivent être systématiquement confrontées aux résultats d'hybridation : le GC % et la taille du génome. C'est sur ces trois paramètres que devrait reposer la définition de l'espèce bactérienne sur le plan génomique.

Dans la famille des *Enterobacteriaceae*, les progrès réalisés grâce à l'hybridation ADN/ADN sont remarquables. On a montré, par exemple, que les genres *Escherichia* et *Shigella* ne formaient qu'un seul groupe génétique ; il en est de même pour les genres *Salmonella* et *Arizona*. Dans le genre *Yersinia*, les espèces *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* appartiennent au même groupe génétique. De nombreux groupes génétiques nouveaux ont été individualisés à ce jour puis étudiés sur le plan phénotypique. Les espèces *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* et *Y. kristensenii* ont été ainsi définies à partir de l'espèce *Y. enterocolitica*.

L'étude d'hybridation ADN/ADN est indispensable à l'individualisation d'une espèce ou d'un genre nouveau. On considère, en ce qui concerne les *Enterobacteriaceae*, que des souches appartiennent à la même espèce lorsqu'elles s'hybrident entre elles à des taux de 70 à 100 %. La mesure de la taille du génome devrait être prise en compte pour définir le pourcentage d'hybridation. Si elle est différente pour les deux ADN (A et B), le taux d'hybridation sera également différent selon le marquage de A ou de B puisqu'il est exprimé par rapport à la longueur du génome marqué.

À l'heure actuelle, toutes les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* ont été hybridées entre elles et une représentation d'arbre phylogénétique a été proposée par Brenner *et al.* *(fig. II.66)*.

4.1.3.3. *Séquençage des ARN ribosomaux*

Selon Woese, les ARN ribosomaux peuvent être considérés comme les meilleurs et les plus précis des « chronomètres moléculaires » par la constance de leurs fonctions, par leur répartition dans tous les organismes, par leur grande taille, parce qu'on peut les séquencer directement et rapidement par la transcriptase inverse. Il existe trois sortes de molécules ribosomique, l'ARN 23S (le « grand » ARNr), qui comporte environ 2 900 nucléotides, l'ARN 16S (le « petit » ARNr), qui en comprend environ 1 540, et l'ARN 5S (« très petit »), qui se compose seulement de 120 nucléotides. L'ARN ribosomal 16s constitue la molécule la plus utile à analyser ; l'ARNr 23S, qui est deux fois plus long, est aussi plus difficile à caractériser et l'ARNr 5S présente parfois dans ses séquences des différences anormales.

La préparation d'ARNr 16S, digérée en présence de ribonucléase T1, donne naissance à de courts fragments oligonucléotidiques comportant jusqu'à 20 bases qui se terminent toujours par un résidu guanyl, par exemple AACUCG. Ces oligonucléotides, qui sont suffisamment courts, peuvent être séquencés facilement grâce aux techniques de séquençage génétique. Dans ce langage, les mots les plus brefs, qui se répètent fréquemment dans chaque molécule, n'ont pas de valeur discriminante ; par contre, lorsqu'ils atteignent 6 nucléotides, il y a peu de chances pour que la séquence qui les caractérise soit représentée plus d'une fois dans la molécule d'ARN 16S. Lorsque les ARN 16S de deux organismes A et B contiennent un ou plusieurs mots semblables (oligonucléotides de même séquence), ils sont apparentés.

Copyrighted material

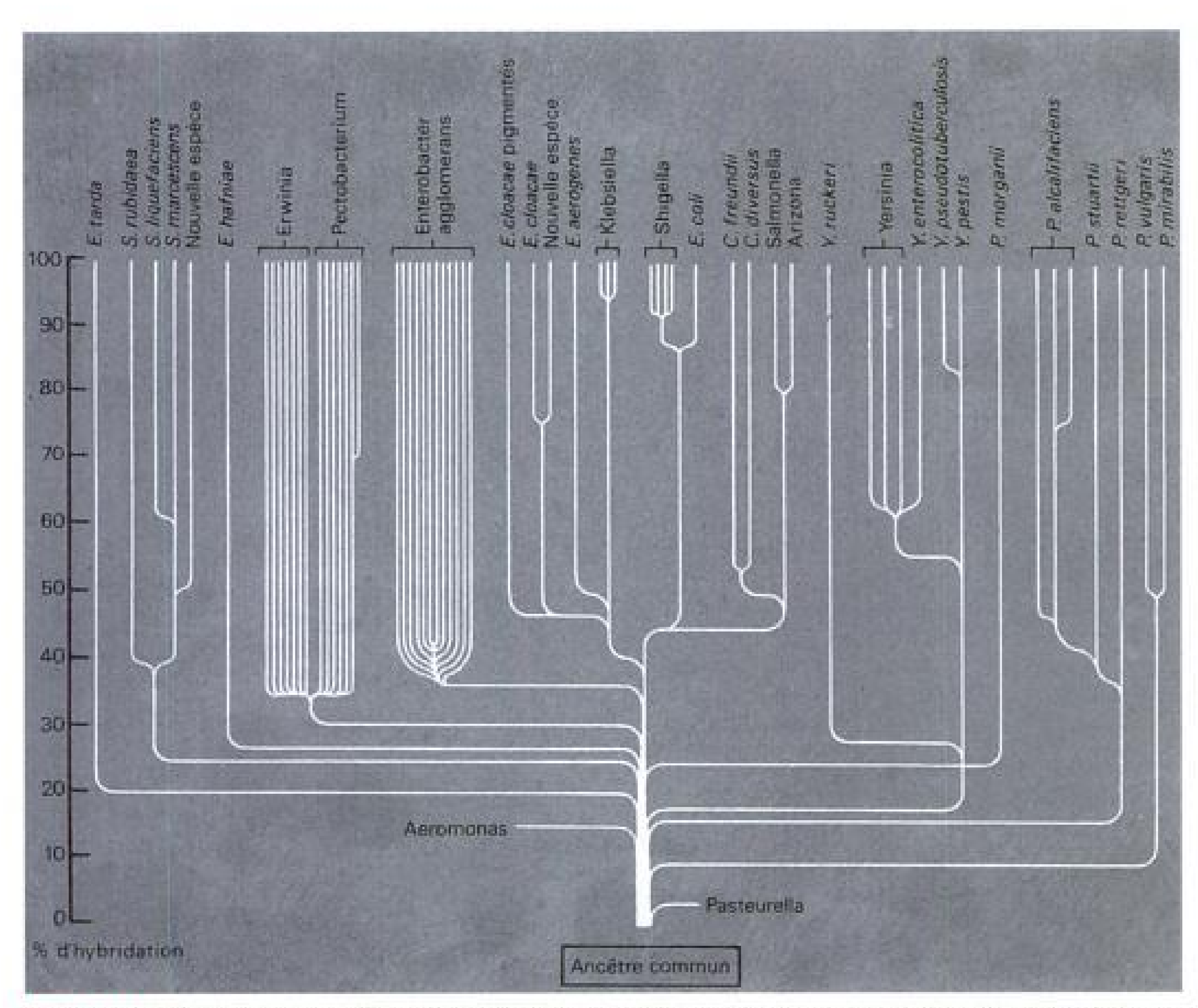


Figure II.66 – Relations génétiques entre les différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*, obtenues par hybridation ADN/ADN.
(D'après Brenner, Prog. Clin. Pathol., 1978, 7, 71-11).

À l'aide de méthodes statistiques, il est possible, à partir d'un grand nombre de micro-organismes, de construire un arbre généalogique représentatif des parentés et des filiations *(fig. II.67)*.

D'importants travaux taxonomiques ont été réalisés au cours de ces dernières années grâce à cette analyse des ARN 16S. Ils ont permis en particulier de distinguer un nouvel ensemble de bactéries, les archéobactéries, qui seraient aussi éloignées des eubactéries (bactéries vraies) que des eucaryotes, d'où la proposition de Woese de diviser le monde vivant en trois règnes primaires, celui des archéobactéries, des eubactéries et des eucaryotes. L'ARNr 16S, présent chez toutes les bactéries, est devenu le chronomètre de l'évolution. La séquence du gène correspondant est connue pour près de 4 000 souches et est accessible par interrogation de bases de données. Cette stratégie permet d'établir un diagnostic lors d'une infection, lorsque l'étiologie bactérienne est suspectée mais qu'aucune bactérie n'a été mise en évidence (si l'on a des bactéries viables non cultivables par exemple). L'ARNr 16S bactérien est en effet détecté et identifié directement à partir des prélèvements cliniques pour la maladie des griffes du chat, l'angiomatose bacillaire ou la maladie de Whipple et lors de gastropathies chez l'homme.

La même démarche a été utilisée pour caractériser les bactéries colonisant les « racines » de *Caulerpa taxifolia* (algue envahissant la Méditerranée).

4.1.4. Caractères immunologiques : taxonomie immunologique

Les bactéries sont des **mosaïques d'antigènes**. Cette complexité antigénique des structures de surface (flagelles, *pili*, paroi, membrane, capsule) peut être mise à profit dans la classification et l'identification. La facilité et la rapidité des tech-

Copyrighted material

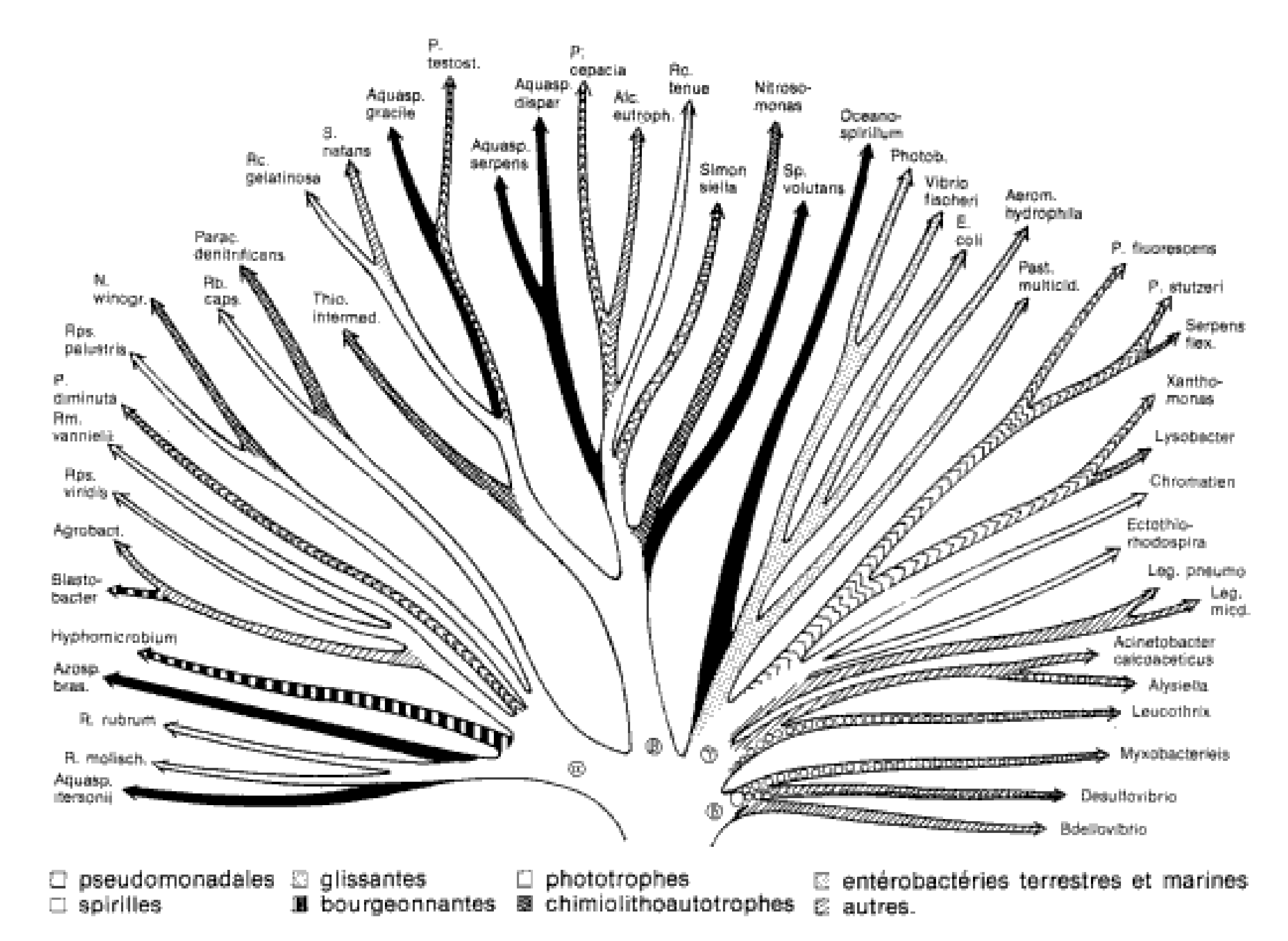


Figure II.67 – **Arbre phylogénique du groupe des bactéries pourpres obtenu à partir des séquences des ARN 5S et 16S.**
(D'après Mme Röhe-Hansen, Institut Zoologique de l'Université Christian Albrecht, Kiel).

niques immunologiques sont en effet des avantages considérables. Dans la famille des *Enterobacteriaceae*, de nombreux genres ou espèces sont ainsi subdivisés en sérotypes. La classification des *Salmonella* (genre), établie par Kauffmann en 1966, comprend actuellement quelque 2 000 sérotypes auxquels il souhaitait donner un rang d'espèce. La classification des *Shigella* (genre) fait appel à des données immunologiques et biochimiques. Les *E. coli* comprennent un grand nombre de sérotypes établis par la mise en évidence des antigènes somatiques (polysaccharidiques) et des antigènes de surface (protéiniques). Ce sont encore les études immunologiques qui ont permis de diviser le genre *Streptococcus* en un certain nombre de groupes sérologiques A, B, C, etc., par extraction d'antigènes polysaccharidiques, spécifiques selon les groupes. De nombreux autres exemples pourraient être donnés de l'intérêt et de l'importance de ces approches immunologiques mais qui, la plupart du temps, interviennent au niveau infraspécifique et, exceptionnellement, à de hauts rangs taxonomiques.

L'étude des homologies immunologiques d'une même protéine issue de deux espèces voisines et choisie pour sa signification phylogénétique peut se révéler, par contre, d'une grande efficacité. Les protéines enzymatiques isofonctionnelles ont, comme leur nom l'indique, les mêmes fonctions métaboliques, quelles que soient les espèces auxquelles elles appartiennent, mais des structures différentes « forgées », au cours de l'évolution, dans ces espèces. Leur étude immunologique comparative permet d'évaluer les relations phylogénétiques entre les espèces ou les genres bactériens. Les méthodes utilisées sont qualitatives ou, mieux, quantitatives (microfixation du complément).

Les résultats obtenus avec la glyceraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase, la phosphatase se sont révélés utiles dans la classification des entérobactéries ; l'étude d'autres enzymes

Copyrighted material

comme l'aspartokinase, la superoxyde dismutase, la DAHP synthétase (3-déoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate) a soulevé des hypothèses révolutionnaires séduisantes entre les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Vibrionaceae*.

La comparaison des structures primaires (séquences primaires) de certaines protéines peut être utilisée pour évaluer les parentés entre les organismes. Les protéines existantes ont en effet probablement évolué par mutation, à partir d'un très petit nombre de protéines archétypes. Plus les différences, dans ces séquences primaires, sont marquées, plus les divergences d'évolution sont grandes entre les deux organismes comparés. Parmi les protéines choisies dans ces études, on peut citer la ferredoxine, la flavodoxine et le cytochrome C. La remarquable similitude de structure du cytochrome C entre certaines bactéries photosynthétiques comme *Rhodopseudomonas capsulatus*, *P. denitrificans* non photosynthétique et les mitochondries des cellules eucaryotes amène à conclure que l'espèce *P. denitrificans* descend en filiation directe du groupe des bactéries pourpres non soufrées par perte de la capacité de photosynthèse et qu'elle est la plus proche du procaryote ancestral, originaire des mitochondries. D'autres types d'analyses plus complexes sont aussi utiles à la classification. Ce sont par exemple les profils cytochromiques que l'on peut comparer entre souches par spectrophotométrie, les profils d'activité de certaines protéines enzymatiques comme les citrates synthétases dont l'inhibition par le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) peut être ou non levée par l'adénosine monophosphate (AMP).

4.1.5. Caractères chimiques : chimiotaxonomie

Au cours des deux dernières décennies, l'application des techniques physico-chimiques à l'analyse des cellules bactériennes ou de leurs composants de structure a donné naissance à des informations de grande valeur pour la classification et l'identification, à tel point que le terme **chimiotaxonomie** est maintenant largement utilisé pour les traduire.

4.1.5.1. Composition de la paroi

Le polymère caractéristique de la paroi de la plupart des procaryotes est le peptidoglycane. Il est en effet présent chez les bactéries à Gram positif ou négatif et chez les cyanobactéries ; il est par contre absent chez les mycoplasmes et les archéobactéries qui, elles, contiennent un constituant nouveau, la pseudomuréine, caractérisé par le remplacement de l'acide muramique par l'acide talosamino-uronique.

Chez les bactéries à Gram négatif, la structure chimique des peptidoglycanes est uniforme, à quelques exceptions près. Par contre, chez les bactéries à Gram positif, la composition des acides aminés de paroi se révèle un critère taxonomique de poids, au niveau du genre, tandis que celle des sucres permet la distinction entre espèces, comme cela a été démontré dans le groupe des bactéries corynéformes par exemple. Les méthodes élaborées par Schleifer et Kandler depuis 1967 ont abouti à la notion de types de peptidoglycanes, ce qui conduit également à la différenciation des bactéries à Gram positif.

4.1.5.1.1. Composition lipidique

Les lipides sont des constituants membranaires de toutes les bactéries : elles sont présentes dans la structure pariétale des bacilles à Gram négatif et de certaines bactéries à Gram positif comme les *Corynebacterium* et les *Mycobacterium*. Ces lipides sont de type acyl (liaison ester) chez les *Eubacterium* ; ils sont à liaison éther avec les *Archaeobacterium*.

La composition en acides gras des cellules bactériennes a fait l'objet de nombreuses analyses ; elle peut être caractéristique de taxons mais son étude se heurte à des problèmes techniques de standardisation (milieu de culture, température…). La catégorie spéciale des acides mycoliques s'est révélée par contre d'un plus grand intérêt. Ce sont des acides à longue chaîne, hydroxylés en – 3 et ramifiés en 2, spécifiques de certains taxons en particulier des genres *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*. Les différences de structure de ces constituants sont des critères de valeur dans la classification de ces groupes.

Une autre classe de lipides de valeur chimiotaxonomique est représentée par les lipides polaires : les plus communs sont les phospholipides et les glycolipides ; les phosphatidylinositol mannosides sont caractéristiques de certains actinomycètes et corynéformes ; les phosphosphingolipides sont rencontrés chez les *Bacteroides*.

Les quinones isoprénoïdes constituent une classe de lipides terpéniques localisée dans la membrane de certaines bactéries. Elles jouent un rôle important dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative. Les trois principaux types sont les ubiquinones, les ménaquinones et les déméthylménaquinones qui sont présents (un ou plusieurs) dans la majorité des organismes procaryotes. Ils sont absents chez les cyanobactéries qui contiennent par contre, des phylloquinones et des plastoquinones, constituants des plantes Les mycoplasmes possèdent seulement des ménaquinones de même que les archéobactéries (excepté l'espèce *Methanobacterium thermoautotrophicum*).

Les bactéries à Gram négatif aérobies strictes ne produisent, pour la plupart, que des ubiquinones ; les bactéries anaérobies facultatives contiennent l'un des trois types ou une de leurs combinaisons ; les anaérobies strictes élaborent uniquement des ménaquinones. La majorité des bactéries à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, synthétisent les seules ménaquinones.

4.1.5.1.2. Profils protéiniques

Les protéines des cellules bactériennes peuvent être extraites puis analysées globalement par électrophorèse et, enfin, comparées entre elles selon

Copyrighted material

leur provenance. On part du principe que des organismes étroitement apparentés doivent posséder en commun des protéines identiques ou proches. Les procédés d'électrophorèse bidimensionnelle et de focalisation isoélectrique peuvent révéler plusieurs centaines de protéines à partir d'un extrait cellulaire. Des méthodes plus simples, comme l'électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide, n'ont pas le même pouvoir de résolution mais permettent de détecter de 30 à 50 bandes protéiniques. Ces profils **(électrophorégrammes)** sont des reflets précis des potentialités génétiques de chaque souche ; ils peuvent être comparés pour mesurer les degrés de parenté entre des souches ou des espèces voisines. En général, ce sont les protéines des cellules totales qui sont extraites puis solubilisées à l'aide d'un détergent tel que le dodécyl sulfate de sodium (SDS). Certains s'adressent, plus simplement encore, aux protéines solubilisées dans l'eau (protéines solubles). De nombreux exemples d'application sont connus dans l'un et l'autre cas ; ils concernent par exemple les *Rhizobium*, les *Haemophilus*, les *Clostridium*, etc.

4.1.6. Nomenclature

4.1.6.1. Principe

La nomenclature, c'est-à-dire la détermination ou l'attribution des noms aux groupes taxonomiques, est le plus souvent considérée comme un sous-produit de la taxonomie ; il est pourtant indispensable d'attribuer des noms stables aux organismes vivants et de réglementer la « façon de faire », ce qui est concrétisé dans le code international de nomenclature des bactéries. On distingue deux catégories de noms :

– les **noms informels** (vernaculaires) ou très spécialisés ou à sens restreint ;

– les **noms scientifiques** des groupes taxonomiques ou **taxons**.

Dans la première catégorie, on peut citer, à titre d'exemple, le colibacille (nom informel), *E. coli* K_{12} (nom spécialisé) ou encore *E. coli* $T^- L^-$ (exigeant en thréonine et en leucine) ; dans la deuxième catégorie, on parlera de l'espèce *E. coli*, du genre *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae*. Les noms scientifiques sont des noms latins, reconnus par tous. Ils appartiennent à des catégories successives qui ont une position dans la hiérarchie, appelée rang. La catégorie la plus basse est celle de l'espèce, chaque catégorie de rang supérieur incluant nécessairement la catégorie de rang inférieur, comme on le voit dans le *tableau II-5* ; l'espèce *(species)* est quelquefois subdivisée en sous-espèces *(subspecies)*.

Les noms scientifiques sont réglementés par le Code international de nomenclature (Lapage *et al.*, 1975). Ils figurent sur la liste des noms de bactéries approuvés (Skerman *et al.*, 1980). Le Code et la liste des noms sont publiés sous l'égide du **Comité international de bactériologie systématique** qui fait lui-même partie de l'**Union internationale des associations de microbiologie**. Pour respecter les buts du code de nomenclature, les noms scientifiques doivent être : (1) stables, (2) dépourvus de toute ambiguïté, (3) nécessaires.

Pour qu'un taxon (par exemple une espèce, *Ps. fluorescens*) soit reconnu par tous, compte tenu de l'insuffisance de certaines descriptions, on s'en réfère au type nomenclatural, c'est-à-dire à un spécimen type, ou souche type, déposé dans un centre ou un institut officiel de collection. Les souches types devraient être des souches typiques que l'on pourrait comparer avec d'autres souches faisant l'objet d'une classification ou d'une identification, conformément au mot « type ».

Les noms scientifiques sont donnés sous forme latine. Leur attribution obéit aux règles de la grammaire latine Le nom d'espèce comprend deux parties : le premier, le nom de genre, est un substantif affecté d'une lettre initiale en majuscule ; le second, l'épithète spécifique, est orthographié avec une lettre initiale en minuscule. L'épithète peut être un adjectif latinisé ou un mot latin ou un génitif ou un substantif mis en opposition. Le nom d'espèce est un nom binominal puisqu'il comprend deux parties. Lorsqu'il s'agit d'une sous-espèce, un nom trinominal lui est attribué. La proposition d'une espèce nouvelle porte l'abréviation « spc. nov. », celle d'un nouveau genre « gen. nov. » et celle d'une nouvelle combinaison « comb. nov. ».

Copyrighted material

4.1.6.2. Grands groupes de bactéries

Il n'existe pas de classification officielle de bactéries mais, comme cela a été vu précédemment, une nomenclature officielle qui permet d'assigner un nom valide à chaque taxon, sur la base d'un code et de règlements internationaux. Cette situation très ouverte laisse place à toutes les hypothèses et propositions possibles pour le classement des bactéries, ce qui est finalement bénéfique pour favoriser les évolutions souhaitables. En l'absence de toute classification officielle, on s'en réfère à ce qui est le plus largement accepté par la communauté des microbiologistes, Les organismes unicellulaires de structure procaryotique, c'est-à-dire les bactéries et les algues bleu-vert, constituent le règne des *Procaryotae*. En cette période de mouvance taxonomique, à titre d'exemple, un extrait de la classification présentée selon Murray (*Bergey's manual,* 2001) est donné dans le *tableau II.6*.

Les procaryotes comprennent quatre divisions reconnues sur la base de l'existence ou non d'une paroi et sur la nature de cette paroi : les *Gracilicutes,* les *Firmicutes,* les *Tenericutes* et les *Mendosicutes.*

Division I : les ***Gracilicutes*** (*gracilis cutis* : peau fine). Ces bactéries ont une paroi de type Gram négatif, comprenant une double membrane externe et interne, une fine couche de peptidoglycane et d'autres constituants situés à la périphérie de la membrane externe ou dans l'espace périplasmique situé entre les deux membranes. La forme des cellules est très variée, sphérique, ovoïde, incurvée, en bâton net, hélicoïdale ou filamenteuse ; d'autres sont enfermées dans une gaine (trichome) ou enchâssées dans une capsule. Leur mode de reproduction habituelle est la scissiparité mais certaines se reproduisent par bourgeonnement et, pour le groupe rare des *Pleurocapsales*, par scission multiple ou éclatement. Des endospores ne sont jamais formées. Des corps fructifiant et des myxospores sont produits par les *Myxobacterales*. Toutes ces bactéries peuvent être mobiles par nage ou par glissement, ou immobiles.

Les membres de la division peuvent être phototrophes ou non. Les premiers rentrent dans les deux classes des *Anoxyphotobacteria* qui effectuent la photosynthèse en anaérobiose (bactéries phototrophes) et des *Oxyphotobacteria* qui l'effectuent en aérobiose. Les seconds constituent la classe de *Scotobacteria*. Les espèces peuvent être aérobies, anaérobies strictes ou facultatives. Certaines sont des parasites intracellulaires.

Division II : les ***Firmicutes*** (*firmus cutis* : peau dure). Ce sont des procaryotes à paroi de type Gram positif. Les cellules peuvent être sphériques, en bâtonnets ou filamenteuses ; les formes bacillaires ou filamenteuses portent quelquefois des ramifications vraies. La reproduction habituelle est la scissiparité. Ces bactéries sont chimiotrophes (chimio-organotrophes), aérobies strictes, anaérobies strictes ou facultatives. La division comprend des bactéries sporogènes (endospores ou hyphes) ou asporogènes ; les actinomycètes et formes apparentées en font également partie.

Division III : les ***Tenericutes*** (*tener cutis* : peau tendre). Ce sont des procaryotes sans paroi, incapables de synthétiser les précurseurs du peptidoglycane ; ils sont entourés d'une membrane unitaire, la membrane cytoplasmique. On les appelle plus communément les mycoplasmes. Les cellules sont très polymorphes, allant de la vésicule de grande taille, déformable, jusqu'à l'élément filtrant, très petit (0,2 µm), en passant par les formes filamenteuses ramifiées ou non. Elles se reproduisent par bourgeonnement, par fragmentation et/ou par scissiparité. Elles sont immobiles ou, rarement, mobiles par glissement. Il n'existe pas de formes de repos. La coloration est négative au Gram.

Ces bactéries exigent, pour la plupart, des milieux complexes pour leur croissance et, au cours de leur développement, elles ont tendance à pénétrer dans les milieux solides pour former des colonies caractéristiques dites en « œufs frits ». Elles ressemblent aux formes L qui sont engendrées par de nombreuses espèces bactériennes mais, contrairement à ces dernières, elles sont incapables de réverser et de resynthétiser une paroi. Les espèces peuvent être différenciées sur la base de leur exigence ou non en cholestérol et en acides gras à longues chaînes. Le contenu en G + C de l'ARNr est de 43 à 48 %, c'est-à-dire plus bas que celui des *Gracilicutes* et des *Firmicutes* (de 50 à 54 %). Le GC % de l'ADN est aussi très bas comparativement, se situant entre 23 et 46 % ; la taille du génome est également inférieure puisque de 0,5 à 1,0 $\times 10^9$ daltons. Tous les mycoplasmes sont résistants aux β-lactamines. Ils peuvent être saprophytes, parasites ou pathogènes.

Division IV : les ***Mendosicutes*** (*mendosus cutis* : peau défectueuse). Ces procaryotes ont, de toute évidence, une origine phylogénétique lointaine, antérieure à celle des *Gracilicutes* et des *Firmicutes* proches des formes ancestrales. La plupart ont une paroi inhabituelle sans acide muramique ; dans certains cas, celle-ci est uniquement protéique ou polysaccharidique ; dans d'autres cas, elle est totalement absente. Leur morphologie est variée, comprenant des *cocci*, des bâtonnets, des filaments et des éléments irréguliers proches des mycoplasmes ; certains sont polymorphes. Ils sont à Gram positif ou négatif. Des endospores ou des formes de repos n'ont jamais été observées. La plupart sont anaérobies stricts mais quelques-uns sont aérobies. Certains sont mobiles et portent des flagelles. Les représentants de cette division ont des habitats et des métabolismes très divers. Ils rassemblent les bactéries du méthane, les bactéries halophiles et les thermoacidophiles qui vivent dans des environnements extrêmes. On les appelle plus habituellement les archéobactéries ; il n'existe en effet qu'une seule classe, celle des *Archeobacteria*.

Copyrighted material

Tableau II.6 – Extrait de la classification du « *Bergey's Manual of systematic bacteriology* » (2001) donnant la position actuelle d'une exemple de sérovar d'*Escherichia coli* dans l'ensemble des 41 nouveaux genres d'Entérobactéries.

Domaine	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Classe III	Gammaproteobacteria
Ordre XIII	Enterobacteriales
Famille I	Enterobacteriaceae
Genre I	*Enterobacter*
Genre II	*Altercoccus*
Genre III	*Arsenophonus*
Genre IV	*Brenneria*
Genre V	*Buchnera*
Genre VI	*Budvicia*
Genre VII	*Buttiauxella*
Genre VIII	*Calymmatobacterium*
Genre IX	*Cedecea*
Genre X	*Citrobacter*
Genre XI	*Edwardsiella*
Genre XII	*Erwinia*
Genre XIII	*Escherichia*
espèce	*Escherichia coli*
Sérovar	*Escherichia coli O157 :H7*
Genre XIV	*Ewingella*
Genre XV	*Hafnia*
Genre XVI	*Klebseilla*
Genre XVII	*Kluyvera*
Genre XVIII	*Leclercia*
Genre XIX	*Leminorella*
Genre XX	*Moellerella*
Genre XXI	*Morganella*
Genre XXII	*Obesumbacterium*
Genre XXIII	*Pantoea*
Genre XXIV	*Pectobacterium*
Genre XXV	*Photohabdus*
Genre XXVI	*Pleisomonas*
Genre XXVII	*Pragia*
Genre XXVIII	*Proteus*
Genre XXIX	*Providencia*
Genre XXX	*Rhanella*
Genre XXXI	*Saccharobacter*
Genre XXXII	*Salmonella*
Genre XXXIII	*Serratia*
Genre XXXIV	*Shigella*
Genre XXXV	*Sodadis*
Genre XXXVI	*Tatumella*
Genre XXXVII	*Trabulsiella*
Genre XXXVII	*Wigglesworthia*
Genre XXXIX	*Xenorhabdus*
Genre XL	*Yersinia*
Genre XLI	*Yokenella*

4.2. Classification des levures et des moisissures

4.2.1. Levures

La classification des levures est naturellement une partie intégrante de celle des champignons (voir § 4.2.2.). Elle est fondée, au moins au départ, sur des caractères morphologiques. Les levures appartiennent à trois grandes classes : *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* et *Fungi imperfecti* (Lodder et Kreger van Rij) *(tab. II.7)*.

4.2.1.1. Levures Ascomycètes (Hémiascomycètes)

Elles forment notamment la famille de *Saccharomycetaceae* divisée en quatre sous-familles :

a) les *Schizosaccharomycetoideae* sont des levures à mycélium et anthrospores : le genre *Schizosaccharomyces* est alcooligène et se rencontre dans les brasseries et distilleries ;

b) les *Saccharomycetoideae* possèdent des cellules bourgeonnantes et ont des spores non fusiformes. Cette sous-famille regroupe de nombreuses espèces intéressant l'industrie alimentaire et appartenant aux genres :

– *Saccharomyces* : levures alcooligènes des industries de fermentation (brasserie, chaix, cidrerie, boulangerie, diététique) ou contaminants,

– *Kluyveromyces* : levures du lait fermentant le lactose, rencontrées dans les fromageries. Elles sont cultivées sur lactosérum pour donner des protéines,

– *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Pichia* : levures contaminant de nombreux aliments ;

c) la sous-famille des *Nadsonioideae* à bourgeonnement bipolaire contient quelques espèces intéressantes appartenant au genre *Hanseniospora* (certaines levures du vin) ;

d) les *Lipomycetoideae* à bourgeonnement et asque en sac ont un intérêt moindre sauf quelques espèces du genre *Lipomyces*.

4.2.1.2. Levures Basidiomycètes

Elles présentent une reproduction sexuée à basidiospores. Cette classe comporte peu de levures d'intérêt industriel.

4.2.1.3. Levures sans sexualité (Deutéromycètes ou Fungi imperfecti)

Elles constituent la famille des *Cryptococcaceae* qui est divisée en quatre sous-familles :

– les *Cryptococcoideae* sont des levures à cellules bourgeonnantes : elles ne forment pas d'arthrospores et n'ont

Copyrighted material

Tableau II.7 – Classification simplifiée des levures.

Classes	Ordres	Familles	Sous-familles	Genres
Ascomycètes (reproduction sexuée dans une asque)	Endomycétales	*Saccharomycetaceae*	*Schizosaccharomycetoideae* *Nadsonioideae* *Lipomycetoideae* *Sacchoromycetoideae*	*Schizosaccharomyces* *Hanseniaspora* *Lipomyces* *Debaryomyces* *Hansenula* *Kluyveromyces* *Pichia* *Saccharomyces*
		Spermophthoraceae		*Coccidiascus*
Basidiomycètes (reproduction sexuée avec basidiospores)	Ustilaginales	*Filobasidiaceae* Levures à téliospores		*Filobasidium* *Leucospiridium*
	Tremellales	*Sirobasidiaceae* *Tremellaceae*		*Sirobasidium* *Tremella*
Deuteromycètes	Blastomycetales	*Cryptococcaceae*	*Cryptococcoideae*	*Brettanomyces* *Candida* *Cryptococcus* *Torulopsis*
			Rhodotoruloideae *Trichospororoideae*	*Rhodotorula* *Trichosporon*
		Sporobolomycetaceae		*Sporobolomyces*

pas de pigments. Cette sous-famille contient des genres importants : *Brettanomyces*, *Candida*, *Torulopsis*. *Kloeckera* dont les espèces interviennent dans l'industrie alimentaire comme agents de fermentation, contaminants ou sources de protéines ;

– les *Rhodotoruloideae (Rhodotorula)* sont pigmentés ;

– les *Trichospororoideae (Trichosporon)* forment des arthrospores. Ce sont des contaminants fréquents ;

– les *Sporobolomycetoideae* qui contiennent peu d'espèces. Quelques-unes appartenant au genre *Sporobolomyces* sont rencontrées parfois comme contaminants des denrées alimentaires.

4.2.2. Moisissures

Nous traitons ici de la classification globale des champignons. Naturellement, les levures peuvent y être incluses (voir § 4.2.1.).

Cette classification est fondée sur des caractères purement morphologiques *(tab. II.8)*.

Aux côtés des Myxomycètes constitués par un plasmode, on trouve les Eumycètes ou vrais champignons.

Les Eumycètes sont répartis en quatre subdivisions principales : Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes, *Fungi imperfecti* (champignons imparfaits).

4.2.2.1. Zygomycètes

Ils possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée. Ils se subdivisent en Oomycètes à sexualité généralement hétérogamique à spore sexuelle endogène (oospore) et à zoospore flagellée, et en Zygomycètes à sexualité isogamique, spore sexuelle exogène (zoospore) et spore végétative non flagellée. Les Oomycètes sont des espèces aquatiques ou parasites des végétaux supérieurs. Les Zygomycètes sont des espèces saprophytes ou parasites : les Mucorales *(Rhizopus, Phycomyces, Mucor...)* font partie des Zygomycètes. Ce sont des agents de maladies des végétaux et, surtout, des contaminants de nombreux produits alimentaires. Certaines espèces de Mucorales sont parfois utilisées industriellement : sauces de soja, saké, produits alimentaires orientaux divers, rouissage.

4.2.2.2. Ascomycètes et Basidiomycètes

• Les Ascomycètes sont caractérisés par la formation endogène des spores (ascospore) contenues dans l'asque. Ils se subdivisent en Hemiascomycètes dont les asques sont libres et qui correspondent essentiellement à des levures, et en Plectomycètes dont les asques sont groupés dans des réceptacles : apothécie, périthèce, cleistothécium. Les Euascomycètes regroupent de nombreux parasites des végétaux, mais aussi de nombreuses moisissures contaminant les produits alimentaires *(Aspergillaceae)*, certains, comme *A. fumigatus*, peuvent être responsables d'infections graves.

• Les Basidiomycètes sont caractérisés par la formation exogène des spores (basidiospores) portées par la baside. Ils se subdivisent en Hémibasidiomycètes, qui correspondent

Copyrighted material

Tableau II.8 – Classification simplifiée des moisissures.

Subdivisions	Classes	Ordres	Genres
Zygomycotina (zygomycètes)	Zygomycètes	Mucorales	*Mucor* *Rhizopus*
Ascomycotina	Plectomycètes	Eurotiales	*Emericella* (*A. nidulans*)
	Pyénomycètes Hémiascomycètes	Spahaeriales Endomycétales (levures)	*Neurospora (N. grassa)* *Eremothecium*
Basidiomycotina (basidiomycètes)	Hémibasidiomycètes	Urénidales Ustilaginales	*Puccinia* *Ustilago*
Deuteromycotina (deutéromycètes)	Hyphomycètes (forme levure = blastomycètes)		*Candida* *Geotrichum*
	Hyphomycètes (forme filamenteuse)	Moniliales	*Aspergillus* (*A. flavus, A. niger*) *Penicillium* (*P. notatum, P. camenbertii, P. roquefortii*)

aux champignons supérieurs et dont la baside n'est pas cloisonnée, et en Protobasidiomycètes dont la baside est cloisonnée et qui sont généralement des parasites des végétaux (*Uredinales, Ustilaginales*).

4.2.2.3. Fungi imperfecti ou Adélomycètes ou Deutéromycètes

Ils constituent un groupe très vaste qui rassemble des champignons dont la sexualité est inconnue ou des variétés asexuées d'Ascomycètes. Ils sont classés en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Les *Aspergillus* et *Penicillium*, par exemple, ont une sexualité rare et sont donc fréquemment classés dans les Adélomycètes.

Ce groupe contient un grand nombre de contaminants des produits alimentaires.

5. Applications au laboratoire

L'étude de la morphologie et de la structure des micro-organismes peut être exploitée pour la classification ou pour l'identification (diagnostic).

5.1. Étude des caractères morphologiques

Les techniques d'examen microscopique permettent d'établir une préidentification « carte d'identité » du micro-organisme étudié.

• **État frais**. Préparation entre lame et lamelle d'une suspension microbienne en milieu liquide, elle permet d'observer la forme et la mobilité. Très utilisable dans le cas des bactéries, elle est moins convaincante pour les moisissures :

– l'état frais peut être adapté : coloré à l'**encre de Chine** pour la mise en évidence de la capsule bactérienne (voir § 2.8.1.) ;

– il peut être mis en œuvre après culture spéciale préalable. Ainsi, le test d'aptitude à la filamentation des levures est réalisé après culture sur milieu PCB (pomme de terre, carotte, bile). De même, l'observation directe de **cultures sur lame** de moisissures permet la mise en évidence des caractères morphologiques particuliers (hyphes, mycélium, spores…).

• **Colorations sur frottis fixé** : coloration au **bleu de méthylène** permettant de colorer toutes les bactéries (les ribosomes fixant le colorant), coloration de **Gram** (voir § 2.2.4.3.), coloration

Copyrighted material

de **Ziehl-Neelsen** permettant de visualiser les bactéries dont la paroi est non seulement capable de résister à l'alcool mais aussi à l'acide. Cette propriété remarquable est due à la présence, dans la paroi, d'acides mycoliques (voir § 2.2.2.6.). Le frottis est d'abord soumis à un colorant, la fuchsine (à chaud), puis à l'action de l'acide sulfurique au 1/4 (ou acide nitrique au 1/3). Ensuite, on fait agir de l'alcool à 95°. Les cellules qui resteront colorées en rouge après avoir résisté à ce double traitement sont appelées **acido-alcoolo-résistantes**. Un colorant de contraste, le bleu de méthylène, révélera les bactéries sensibles à ce traitement.

- **Colorations spécifiques** : coloration des inclusions de glycogène, d'amidon (voir § 2.4.2.), coloration des **corpuscules métachromatiques** (voir § 2.4.2.) telle celle d'Ernt-Neisser où l'on fait agir une solution de bleu acétique à chaud puis une solution de vésuvine, coloration de Feulgen (voir § 2.5.1.), coloration des cils (voir § 2.8.3.1.) où, sous l'action d'un mordant puis d'un colorant, les cils s'épaississent et deviennent visibles (dans la coloration de Rhodes, on utilise le nitrate d'argent ammoniacal comme colorant), coloration des spores bactériennes (voir § 2.9.1.), dans laquelle le colorant ne peut pénétrer qu'après un traitement préalable destiné à perméabiliser les enveloppes (dans la coloration de Möller, on traite le frottis par de l'acide chromique et on colore par de la fuchsine à chaud).

5.2. Test de stérilité

La résistance des spores est mise à profit pour réaliser des tests de stérilisation ; à cet effet, des échantillons de spores d'espèces bactériennes précises sont traités de la même façon que les produits à stériliser et on analyse la survie éventuelle. En présence d'une subculture, on pourra affirmer que le processus de stérilisation n'a pas été efficace *(tab. II.9)*.

Tableau II.9 – Quelques espèces utilisées comme souche test de stérilisation.

Nature du produit ou de la méthode	Espèce
Autoclavage	*B. stearothermophilus*
	B. subtilis (ATCC 6633)
Chaleur sèche ou gaz (oxyde d'éthylène)	*B. subtilis* (ATCC 9372)
Rayons gamma	*B. pumilus*
Aliments sous emballage	*Cl. sporogenes*

5.3. Étude des caractères antigéniques

Essentiellement réservée à l'identification bactérienne, cette étude permet de :

– rechercher et caractériser les antigènes spécifiques d'une bactérie afin de l'identifier : c'est le **sérotypage** ;

– rechercher et mesurer dans le sérum d'un malade le taux des anticorps apparus à la suite d'une infection : c'est le **sérodiagnostic**.

Dans le premier cas, on recherchera des antigènes inconnus à l'aide de préparations d'anticorps (immunsérums) connues. Dans le second, on détectera des anticorps inconnus et on en mesurera le taux à l'aide de suspensions antigéniques connues.

5.3.1. Sérotypage

Les bactéries sont caractérisées par leurs antigènes. Chez les entérobactéries, par exemple, on distingue :

– les antigènes de paroi ou **antigènes O** (voir § 2.2.4.1.2.) ;

– les antigènes flagellaires ou **antigènes H** (voir § 2.8.3.2.3.) ;

– les antigènes de surface (capsule ou enveloppe) appelés **antigènes K** (voir § 2.8.1.3.).

L'étude de ces différents antigènes permet de classer en sérotypes les bactéries appartenant à une même espèce. Elle présente un grand intérêt diagnostique et épidémiologique, en particulier pour certaines espèces comme les *Salmonella*, les *Shigella*, les *E. coli*, etc.

Pour mettre en évidence ces antigènes, on dispose de batteries de sérums qui, au contact de leurs antigènes spécifiques, les révèlent par **agglutination**. Chaque sérotype est caractérisé par une

Copyrighted material

mosaïque d'antigènes dont la recherche aboutit à l'identification. Par exemple :

– pour les *Salmonella*, on les caractérise par la recherche de leurs antigènes O et H selon la classification établie par Kaufmann et White (voir § 2.2.4.1.2.) ;

– pour les *E. coli* GEI (responsables de gastro-entérites infantiles), on recherche les antigènes O et K. On établit ainsi pour chaque sérotype une formule Oa Kb caractéristique.

Les anticorps sont **polyclonaux** ou **monoclonaux**. Les caractéristiques et les limites des anticorps polyclonaux sont bien connues. Lorsqu'on injecte des bactéries entières chez l'animal, celui-ci va produire de très nombreux anticorps spécifiques des différents épitopes des constituants de surface. La variété de ces épitopes nécessite d'éliminer par épuisement les anticorps non désirables pour sélectionner les anticorps utiles au niveau de l'espèce ou au niveau infraspécifique. Les opérations nécessaires sont souvent délicates (épuisement imparfait des « mauvais » anticorps ou élimination partielle des « bons » anticorps). La spécificité des anticorps polyclonaux pourrait être améliorée en préparant des antigènes purifiés. Cette approche présente aussi des difficultés et des limites dues à la pureté relative des antigènes, à la destruction de certains épitopes fragiles, à l'apparition d'épitopes marqués chez la bactérie… Par ailleurs la standardisation de ces sérums pose problème ; leur composition varie de lot à lot selon les conditions d'immunisation, en particulier de la durée, selon les animaux. Les anticorps monoclonaux ne sont pas soumis à tous ces inconvénients mais leur très grande spécificité (pour un épitope) peut se révéler quelquefois néfaste car non représentative de l'ensemble de la structure antigénique. C'est la raison pour laquelle ces anticorps monoclonaux doivent faire l'objet d'une évaluation approfondie de leur spécificité.

D'autres techniques immunologiques peuvent être mises en œuvre pour le diagnostic : par exemple l'**immunofluorescence** pour détecter les *E. coli* GEI dans les selles. On prépare une suspension de matières fécales et on effectue des frottis fixés que l'on recouvre d'anticorps fluorescents. L'observation de la lame au microscope disposant d'une source UV révèle les *E. coli* GEI sous forme de bacilles fluorescents (zone verdâtre étincelante entourant le corps bactérien).

5.3.2. Sérodiagnostic

On recherche, dans le sérum d'un malade, la présence d'**agglutinines** élaborées dans l'organisme au cours de l'infection. La méthode consiste à mettre en présence le sérum du malade (pur puis dilué) et la bactérie que l'on suppose responsable de la maladie.

Dans le sérodiagnostic de Widal-Félix pour la fièvre typhoïde, on dispose de suspensions antigéniques O et H provenant des quatre principales espèces responsables, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B et *S. paratyphi* C. Chacune d'entre elles est mise en contact, en tube, avec le sérum et ses dilutions, ce qui permet de détecter par agglutination le germe responsable et de mesurer le taux des agglutinines.

Les agglutinations sont de plusieurs types selon l'antigène :

– avec les antigènes O, l'agglutination est granulaire, fine, lente à apparaître et difficile à dissocier ;

– avec les antigènes H, l'agglutination est floconneuse, rapide à apparaître et facile à dissocier.

Le sérodiagnostic par agglutination est aussi applicable aux brucelloses, à la tularémie, aux leptospiroses.

5.4. Lysotypie

Certaines bactéries ont la propriété de fixer des virus appelés **bactériophages** (voir § 2.2.4.2. et chap. VIII § 2.3.). Ceci a pu être utilisé pour les identifier. On détermine alors ce que l'on appelle le **lysotype** (ou **lysovar**). Cette méthode est fondée sur le fait que, dans certains cas, la fixation du bactériophage est suivie de la lyse cellulaire (**infection lytique**).

On dispose d'une batterie de bactériophages que l'on met en contact avec le germe isolé. On cultive ensuite le mélange par ensemencement en nappe sur milieu solide. La lyse bactérienne sera alors visualisée par la présence de petites zones transparentes dans le tapis bactérien opaque. Ces zones sont appelées **plages de lyse**.

Le germe sera donc identifié par le ou les bactériophages auxquels il est sensible.

5.5. Génotypie

Avec les progrès récents de la biologie moléculaire, sont apparues de nouvelles techniques permettant de caractériser une souche par ses

Copyrighted material

particularités génétiques et d'établir ainsi son génotype.

Hormis les techniques envisagées au § 4.1.3. lors de l'étude de la taxonomie génétique, l'établissement de cartes génétiques par utilisation des enzymes de restriction, l'**amplification des gènes** et l'électrophorèse en champ pulsé constituent les méthodes les plus récentes appliquées ici.

• **La cartographie génétique**. Après extraction et purification de l'ADN, on procède à son traitement enzymatique par des enzymes de restriction (voir chap. VI). Ces enzymes, isolées de diverses espèces bactériennes, possèdent la particularité d'avoir une spécificité endonucléasique précise. Les fragments obtenus sont ensuite séparés et analysés par électrophorèse en gel d'agarose. On obtient ce que l'on appelle des « cartes de restriction », sortes de cartes d'identité du génome.

• **L'amplification des gènes**. Cette technique permet d'obtenir, en grande quantité, le fragment d'ADN que l'on souhaite étudier. Elle utilise une méthode connue sous le sigle PCR *(polymerase chain reaction)* qui consiste, après séparation des deux brins d'ADN, à les copier à l'aide d'une polymérase de façon à obtenir deux nouvelles molécules identiques. À leur tour, les brins les constituant seront séparés et copiés de la même manière et ainsi de suite. On peut obtenir ainsi de multiples copies de l'ADN étudié.

• **L'électrophorèse en champ pulsé**. Elle permet la séparation de molécules d'ADN selon leur taille et leur aptitude à migrer dans un champ électrique. Il s'agit d'une électrophorèse au cours de laquelle deux champs d'orientation différente sont appliqués alternativement, les molécules subissant alors une réorientation plus rapide pour les petites molécules, ce qui permet de les séparer.

Par ailleurs, chez les micro-organismes eucaryotes, outre l'étudie de l'ADN chromosomique, on se penche de plus en plus sur la caractérisation de l'ADN mitochondrial.

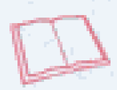
Ainsi, l'identification des souches œnologiques de *Sc. cereviseae* fait appel à l'analyse de l'ADN mitochondrial. Après préparation de protoplastes et leur éclatement dans un tampon de lyse, l'ADN mitochondrial est séparé de l'ADN chromosomique par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium puis purifié. On le traite ensuite par des enzymes de restriction et les fragments sont séparés et analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Une autre technique fait appel à la séparation des chromosomes entiers de la levure. Cette méthode utilise la récente technique d'électrophorèse en champ pulsé vue ci-dessus.

Des systèmes de typage moléculaire fondés sur les méthodes les plus performantes, comme la ribotypie, l'identification automatique des profils (logiciel Taxotron®), ont été mis au point. Des bases de données pour l'identification automatique des ribotypes ont été créées pour *E. coli, Shigella, Salmonella* sérotype *typhi, Pseudomonas, Vibrio cholerae* et *Corynebacterium diphtheriae.*

Toute épidémiologie concernant des infections bactériennes nécessite la comparaison fine des souches en cause : c'est le typage. La ribotypie (ou étude des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomaux) est devenue une méthode de typage essentielle pour diverses espèces bactériennes dont *E. coli, V. cholerae, Y. pestis, Salmonella, V. anguillarum* et autres vibrions pathogènes pour les poissons. Des sondes non radioactives sont actuellement utilisées : sonde ARNr marquée à l'acétylaminofluorène (AAF) ou sonde constituée de 5 oligonucléotides marqués à la digoxigénine. Le traitement des données utilise les logiciels de l'ensemble Taxotron® (Institut Pasteur, Paris). Le pathotype entérohémorragique d'*E. coli* (EHEC) semble s'étendre en France, aussi les outils de diagnostic sont mis au point ou validés comme les systèmes de détection des gènes codant les vérotoxines, des gènes d'adhésion aux cellules épithéliales, des gènes d'invasivité et de l'entérohémolysine.

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

Bactéries

1. Donner un schéma d'ensemble de la cellule bactérienne faisant apparaître les éléments constants et facultatifs.

2. Expliquer les rôles de la paroi.

3. Donner un schéma simplifié de la paroi de différents groupes bactériens : *Staphylococcus*, bacille à Gram négatif.

4. Indiquer la nature chimique et les rôles des principales macromolécules constitutives de la paroi.

5. Expliquer l'architecture de la membrane cytoplasmique à partir des propriétés des phospholipides (en liaison avec le cours de biochimie).

6. Expliquer le rôle des protéines transmembranaires et des protéines externes.

7. Récapituler les fonctions de la membrane cytoplasmique.

8. Citer les différents types d'inclusions, leur nature chimique et leur rôle.

9. Décrire des techniques d'étude de l'appareil nucléaire.

10. Expliquer le rôle du chromosome bactérien et des plasmides.

12. Décrire les techniques de mise en évidence des flagelles et les différents types de ciliatures.

13. Décrire les techniques de mise en évidence des capsules.

14. Expliquer les rôles des capsules.

15. Citer les deux types fonctionnels de *pili*, préciser leurs rôles.

16. Décrire les techniques de mise en évidence des spores.

17. Présenter le schéma d'une spore.

18. Décrire les phénomènes morphologiques et biochimiques accompagnant la sporulation.

19. Citer les conditions favorables à la germination des spores et les conditions l'inhibant.

20. Citer les bactéries sporulées les plus fréquentes.

21. Citer les propriétés des spores et expliquer les conséquences au niveau des bio-industries (conservation, aseptisation… en liaison avec le chap. V).

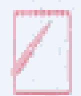
Levures et moisissures

1. Produire un schéma annoté d'une cellule fongique.

2. Citer les macromolécules les plus fréquentes présentes dans la paroi des levures et des moisissures.

3. Décrire deux types de filaments mycéliens.

4. Définir le terme structure cœnotypique



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes.

1. Le terme……………. désigne les bactéries de forme sphérique.

2. Enveloppe caractéristique de la cellule bactérienne ? la………… est constituée d'un polymère, le………………………, encore appelé……………. ou………………………..

3. Les…………… représentent les protéines majeures de la……………………………….. de la paroi des bactéries à Gram négatif.

4. Autre constituant de la paroi des bactéries à Gram négatif, le LPS ou………………………….. est également appelé………………….. car après lyse cellulaire, il est libéré et constitue un mode d'expression du……………………………

5. En présence de lysozyme et de saccharose, un bacille à Gram négatif donne naissance à un……………………, cellule……………………… ayant perdu sa forme bacillaire.

6. Le chromosome bactérien sous forme……………………….. se distingue de la forme……………… par une structure plus compacte et un encombrement plus réduit. Ce phénomène est dû à la présence d'une enzyme, la……………, appartenant au groupe des………………………..

7. Lors de sa réplication, l'ADN bactérien se sépare en deux, chacun des deux brins servant de modèle (……………….) à la synthèse d'un nouveau brin selon un mode appelé……………………………….. Ce phénomène est……………………………., la synthèse progressant le long de la molécule de part et d'autre du point de départ appelé………………………..

8. Les plasmides………………………… se distinguent par le fait qu'ils peuvent être transmis d'une bactérie à une autre par………………………., nécessitant un contact intercytoplasmique entre les cellules.

9. Le……………………….. des salmonelles consiste à identifier ces bactéries selon leurs caractéristiques antigéniques en recherchant les spécificités au niveau des antigènes O (…………………………..) et des antigènes H (………………………………..) selon la classification de………………………………

10. Le terme………………………… désigne le fait que les moisissures présentent une organisation végétative………………………… où les cellules, ayant perdu les membranes les séparant, forment finalement une cellule unique………………………

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. Les divers arrangements bactériens (chaînettes, grappes, tétrades…) sont les résultats de l'association de cellules entre elles grâce à des pontages intermembranaires.

2. Les acides teichoïques sont des composants caractéristiques de la paroi des bactéries à Gram positif.

3. La composition et la structure différentes de la paroi des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif font que ces dernières laissent pénétrer très difficilement l'alcool par rapport aux autres lors de la coloration de Gram.

4. Le lysozyme a pour spécificité de rompre les liaisons β1-4 du peptidoglycane.

5. Le terme « uniport » désigne un type de transport actif dans une seule direction.

6. Pour une même molécule d'ADN, elle migrera plus rapidement en électrophorèse en gel d'agarose si elle se trouve sous forme superenroulée.

7. Le mode de réplication dit semi-conservatif est appelé ainsi car il permet la conservation intégrale de 50 % de la quantité d'ADN présente dans la cellule mère.

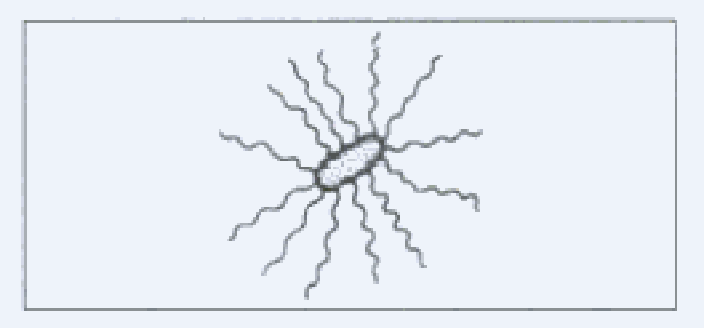
8. Les termes « spore dormante » et « préspore » désignent le même stade de la sporulation bactérienne.

9. Comme chez les bactéries, le noyau des levures est en fait un « appareil nucléaire » ne présentant aucune enveloppe nucléaire.

10. La caractéristique morphologique principale différenciant les moisissures des bactéries est celle de présenter une organisation multicellulaire, le mycélium.

3. Flagelles et mobilité

1. Mise en évidence des flagelles : la figure ci-dessous est un dessin d'une bactérie observée en microscopie optique, après coloration spéciale. À quel artifice technique a-t-on eu recours pour visualiser les flagelles ? Pourquoi ?



2. Quelle est la ciliature montrée sur cette figure ? Donner deux exemples de bactéries possédant une telle ciliature.

3. Quelles autres ciliatures peut-on rencontrer chez les bactéries que vous avez étudiées ? Répondre sous forme de schémas commentés. Donner un exemple de bactérie pour chaque ciliature.

4. Préciser la relation existant entre la ciliature d'une bactérie mobile et son type de mouvement sur un état frais.

4. *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulagricus est un bacille de grande taille à Gram positif.

1. Schématiser la structure de la paroi de ce bacille.

2. Action du lysozyme sur cette paroi.

2.1. Donner une définition du lysozyme en précisant son site d'action au niveau de la paroi.

2.2. Qu'advient-il des bactéries traitées au lysozyme placées dans de l'eau distillée ? Justifier.

2.3. Qu'advient-il des bactéries traitées au lysozyme placées dans un milieu isotonique ? Justifier et préciser le nom des cellules obtenues.

2.4. Dégager de ces deux expériences les rôles de la paroi.

5. Paroi bactérienne

1. On centrifuge 25 mL d'une culture de *Bacillus megaterium* prélevés en fin de phase exponentielle de croissance. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 20 mL de tampon phosphate 0,04 $mol \cdot L^{-1}$ pH 7,2 de façon à laver les cellules bactériennes. Après avoir de nouveau centrifugé, décanté et recommencé deux fois le lavage, on remet le culot de cellules bactériennes en suspension dans 2,5 mL de tampon phosphate pH 7,2.

À 1 mL de la suspension cellulaire, on ajoute 1 mL de solution de saccharose à 2 $mol \cdot L^{-1}$: tube n° 1.

À 1 mL de la suspension cellulaire, on ajoute 1 mL d'eau distillée : tube n° 2.

Après homogénéisation, les deux tubes sont mis à incuber pendant 2 minutes à 37 °C. Les états frais réalisés sur les deux tubes sont schématisés sur la figure 1.

1.1. Comparer les résultats des deux observations microscopiques.

1.2. Les justifier par les conditions expérimentales.

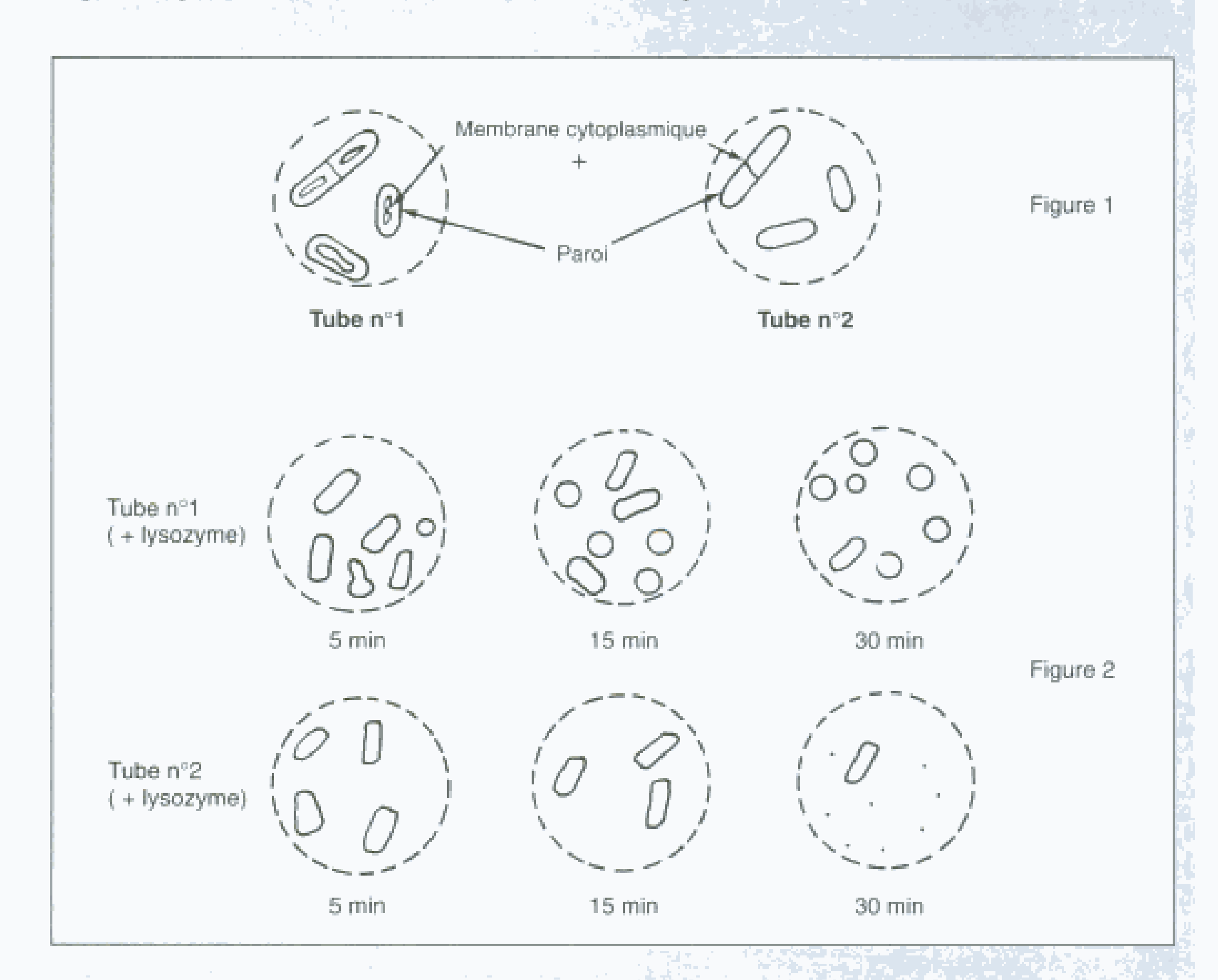
2. On ajoute dans les deux suspensions précédentes (tubes n° 1 et 2) 0,2 mL de lysozyme. On examine au microscope optique avec l'objectif à immersion les deux suspensions après 5, 15 et 30 minutes d'incubation à 37 °C. Les observations microscopiques sont schématisées sur la figure 2.

2.1. Que deviennent les cellules bactériennes dans les tubes n° 1 et 2 ?

2.2. Préciser le rôle du lysozyme.

2.3. Interpréter les observations microscopiques en fonction des conditions expérimentales imposées aux tubes n° 1 et 2.

3. Les mycoplasmes ne sont pas sensibles au lysozyme. Pourquoi ?



6. Archéobactéries

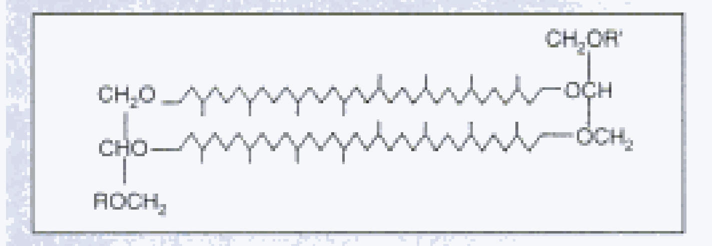
1. La paroi.

Pour certaines achéobactéries, la paroi est constituée d'une couche unique épaisse et homogène de pseudomuréine ; pour d'autres, elle est formée d'une couche de protéines ou de glycoprotéines externe à la membrane plasmique. La pseudomuréine est un peptidoglycane dans lequel sont remplacés, respectivement, l'acide N-acétylmuramique par l'acide N-acétyltalosaminuronique, la liaison β1-4 par une liaison β1-3 et les acides aminés D par des acides aminés L. Expliquer l'insensibilité des archéobactéries à l'action des antibiotiques à noyau β-lactame (pénicillines, céphalosporines) ainsi qu'à celle du lysozyme.

2. La membrane.

La membrane plasmique de certaines archéobactéries thermophiles se compose, dans sa partie lipidique, d'un unique

feuillet de molécules de tétraéthers dont la structure schématique est représentée sur la figure ci-dessous.



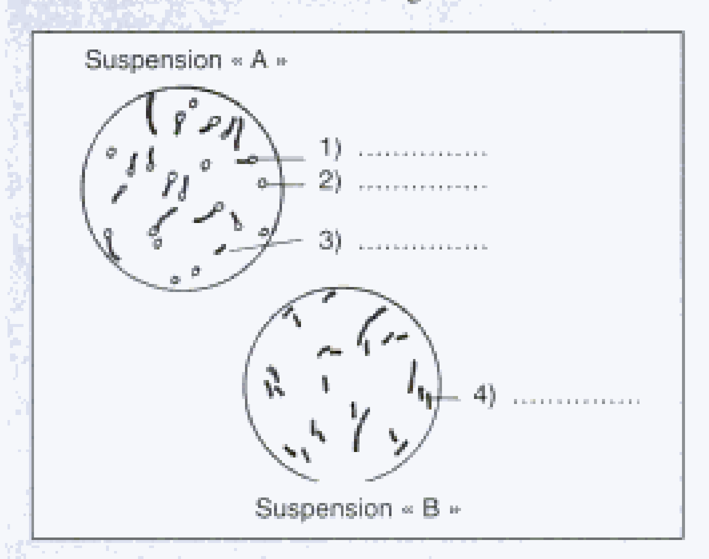
Analyser, en s'aidant de schémas, les analogies et les différences entre cette membrane et celles des autres cellules (eubactéries et eucaryotes). En quoi ces différences expliquent-elles l'adaptation aux températures extrêmes ?

7. Aspects structuraux de *Clostridium tetani*

Une suspension de *Cl. tetani* est laissée 15 jours à température du laboratoire : on l'appelle suspension A. Une suspension B est préparée à partir d'une culture jeune de 24 h.

1. On effectue une coloration de Gram respectivement sur les suspensions A et B. On obtient les résultats de la figure ci-dessous.

1.1. Annoter les schémas de la figure.



1.2. Quel phénomène biologique a eu lieu dans la suspension A ? En dégager les différentes étapes.

2. On chauffe à 80 °C pendant 10 minutes les suspensions A et B. On ensemence ensuite 0,1 mL de chaque suspension chauffée sur un milieu d'isolement approprié. Après incubation, on observe de très nombreuses colonies sur l'isolement fait à partir de A et une colonie sur l'isolement fait à partir de B.

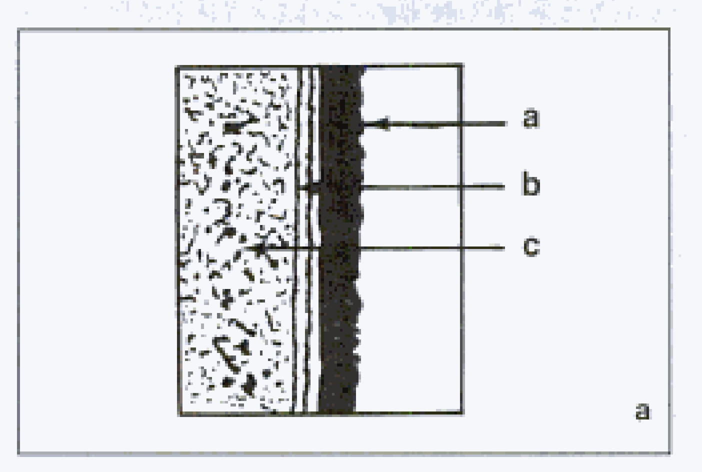
2.1. D'après ces résultats, que pouvez-vous déduire comme propriété des formes bactériennes apparues dans la suspension A ? À quelles caractéristiques est liée cette propriété ?

2.2. Quel phénomène s'est-il produit lorsque la suspension A a été ensemencée dans le milieu d'isolement ?

8. *Bacillus subtilis*

1. La figure ci-dessous représente le schéma d'une coupe de *Bacillus subtilis* observée au microscope électronique.

1.1. Annoter le schéma a.

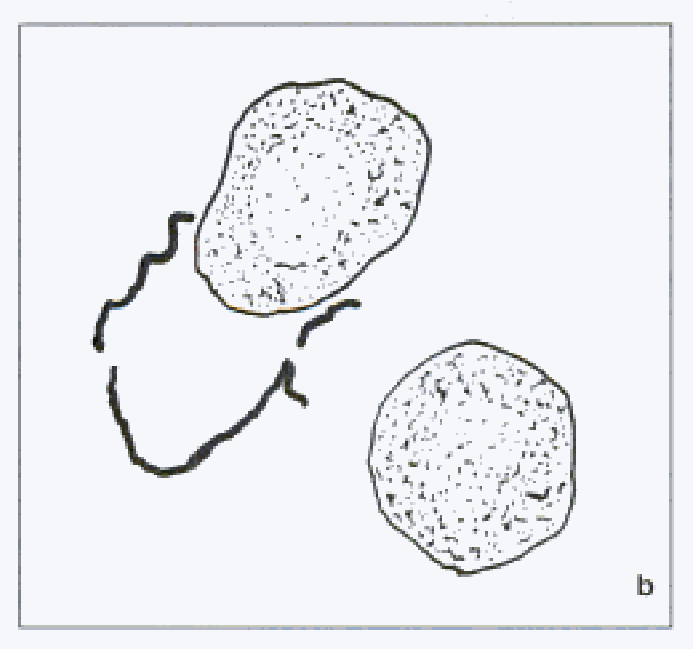


1.2. Quel est le constituant fondamental de la paroi ? En schématiser la structure de base.

2. On prépare deux suspensions de *B. subtilis*, l'une dans l'eau, l'autre dans une solution aqueuse de saccharose à 0,3 mol · L^{-1}. Les bactéries sont ensuite traitées par le lysozyme. La première suspension s'éclaircit rapidement avec une diminution d'absorbance atteignant 97 % en une vingtaine de minutes. L'absorbance de la deuxième suspension ne diminue que de 20 % pendant le même temps. L'examen en microscopie électronique des bactéries présentes dans la deuxième suspension révèle différentes formes bactériennes représentées sur la figure b.

2.1. Indiquer l'action du lysozyme sur la paroi bactérienne et interpréter les observations précédentes.

2.2. Annoter et commenter le schéma b.

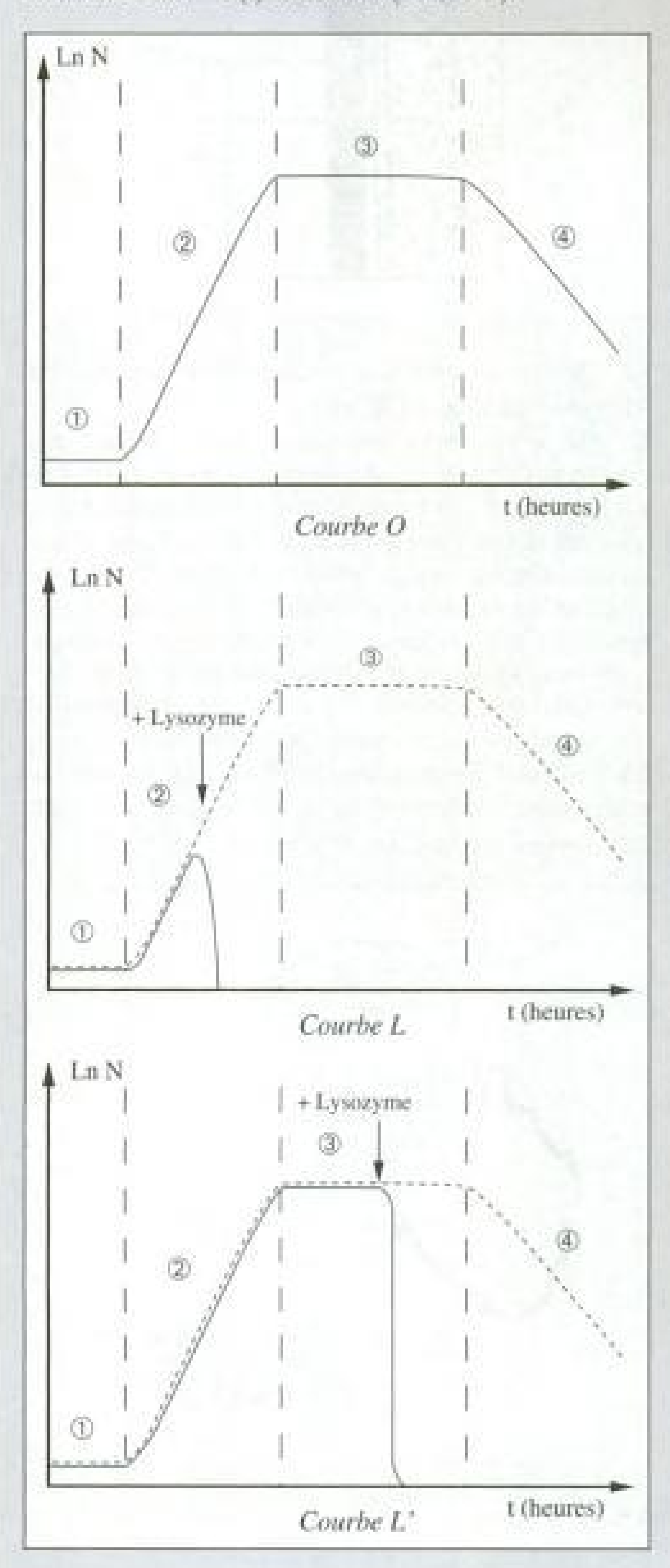


2.3. Quel rôle de la paroi est ainsi mis en évidence ?

2.4. Un antibiotique, la pénicilline, agit également sur la paroi. Comparer son mode d'action avec celui du lysozyme.

9. Étude de l'action du lysozyme sur *Listeria monocytogenes*

Dans une culture de *Listeria monocytogenes* en milieu liquide, on mesure le nombre N de bactéries par cm^3 de milieu en fonction du temps. On trace ainsi la courbe de croissance LnN = f (t) ci-dessous (courbe O).



1. Commenter l'allure générale de cette courbe et analyser les différentes phases.

On veut étudier alors l'action du lysozyme. Pour cela on en ajoute :

– dans une culture identique en phase 2, et l'on obtient la courbe L ;

– dans une culture identique en phase 3, et l'on obtient la courbe L'.

Ces courbes sont données ci-dessous en trait plein avec le tracé de la courbe sans lysozyme en trait pointillé.

2. Analyser ces courbes.

3. Les interpréter en précisant l'action du lysozyme sur les bactéries à Gram positif.

10. Structure des salmonelles et rôle dans leur classification

1. Étude de la structure des *Salmonella*.

1.1. Faire un schéma structural simple d'une *Salmonella* montrant tous les éléments constitutifs de la bactérie.

Ce schéma est-il valable pour toutes les espèces de *Salmonella* ? Justifier la réponse.

1.2. Quels sont les antigènes recherchés. Préciser leur nature chimique et leur localisation.

2. Les antigènes ainsi définis ont permis d'élaborer une classification des *Salmonella*. Cette classification (dite de Kauffmann-White) est surtout effectuée dans un but épidémiologique.

2.1. Expliquer l'expression « but épidémiologique ».

2.2. Indiquer sommairement le principe général de la classification des *Salmonella* selon Kauffmann-White.

11. Éléments de structure cellulaire

Sur des photographies prises en microscopie électronique, il est possible d'observer les ribosomes et l'appareil nucléaire d'une cellule bactérienne.

1. Quel est l'aspect des ribosomes sur un tel document ? Indiquer leur composition chimique et leur rôle dans la cellule.

2. Quel est l'aspect de l'appareil nucléaire ?

2.1. Quelle particularité présente-t-il ?

2.2. Préciser la forme du chromosome bactérien, la nature chimique et la structure schématique de son constituant essentiel.

2.3. Quel est le mode de réplication de ce constituant ? Par quel type d'expérience a-t-on pu prouver ce mode de réplication ?

2.4. Préciser sa fonction dans la cellule.

12. Étude structurale de *Bacillus subtilis*

Étude de la sporulation. On effectue une observation au microscope à contraste de phase (fig. 13.1.). Il s'agit d'une culture en bouillon ordinaire de 72 heures à 37 °C.

Copyrighted material



1. Interpréter cette observation.

2. À l'aide d'un schéma, donner la structure de l'élément apparu. Quels sont les rôles et propriétés de cet élément ?

3. On chauffe ce bouillon de 72 heures à 70 °C pendant 10 minutes, puis on repique cette culture dans un bouillon ordinaire neuf. Au bout de 24 heures de culture à 37 °C, on effectue une observation au microscope à contraste de phase (fig. 13.2.). Expliquer ce qui s'est passé durant les 24 heures de culture et le rôle du chauffage de 10 minutes à 70 °C.



13. Structure comparée des bactéries à Gram positif et négatif

Haemophilus influenzae, petit bacille à Gram négatif, et *Streptococcus pneumoniae*, diplocoque à Gram positif, présentent quelques analogies et différences de structure. Ces deux espèces possèdent fréquemment une capsule.

1. La capsule.

1.1. En donner la définition et la situer dans la cellule bactérienne.

1.2. Préciser la nature chimique de la capsule de *Str. pneumoniae*.

1.3. Pour chacune de ces deux espèces, on peut définir plusieurs sérotypes. Pourquoi ?

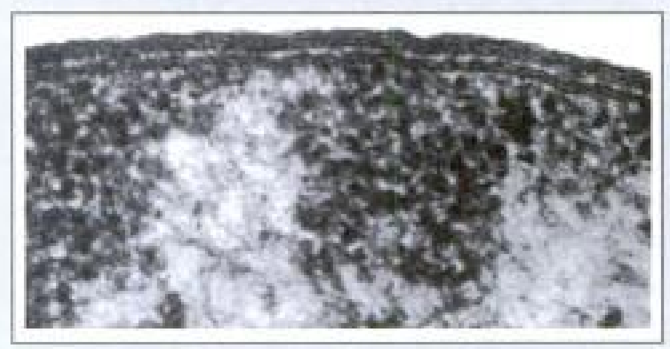
1.4. Les bactéries capsulées sont très virulentes. Pourquoi ?

2. Les photos de la paroi de chacune de ces bactéries prises au microscope électronique sont reproduites sur le document ci-dessous.

2.1. À quelle bactérie attribuer chacune de ces photos ? Justifier.

2.2. Reproduire les photos sous forme de schémas simples et annotés.

2.3. Comparer succinctement les compositions chimiques des deux parois.





Copyrighted material

CORRIGÉS

1. Compléter par :

1. Cocci.
2. Paroi, peptidoglycane, muréine, mucocomplexe.
3. Porines, membrane externe.
4. Lipopolysaccharide, endotoxine, pouvoir pathogène.
5. Sphéroplaste, sans paroi.
6. Superenroulée, relaxée, gyrase, topo-isomérases.
7. Matrice, semi-conservatif, bidirectionnel, origine de réplication.
8. Conjugatifs, conjugaison.
9. Sérotypage, antigènes de paroi ou somatiques, antigènes flagellaires, Kauffmann-White.
10. Cœnocytique, multicellulaire, multinucléée.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : ils résultent de la séparation incomplète des cellules filles en fin de division cellulaire.
2. Vrai.
3. Faux : c'est l'inverse, l'alcool a un pouvoir pénétrant moins important chez les Gram positif.
4. Vrai.
5. Faux : il désigne le fait qu'une seule substance est transportée à la fois.
6. Vrai.
7. Faux : il désigne le fait que l'on retrouve dans chacune des deux cellules filles une molécule d'ADN composée d'un brin provenant de la molécule de la cellule mère, l'autre brin étant néosynthétisé par copie du brin parental.
8. Faux : le terme « préspore » désigne le stade où le septum transversal a conduit à une future spore individualisée à l'intérieur de la cellule végétative. L'expression « spore dormante » désigne, lui, la spore terminée, libre, avec un métabolisme au ralenti.
9. Faux : il s'agit d'un « vrai » noyau, possédant une enveloppe nucléaire de type eucaryote persistant lors de la division cellulaire.
10. Vrai.

3. Flagelles et mobilité

1. On épaissit les flagelles pour les rendre visibles au microscope. Imprégnation argentique (coloration de Rhodes et Fontana-Tribondeau, voir chap. II, § 2.8.3.1.).
2. Ciliature péritriche *(E. coli, Proteus vulgaris).*
3. Ciliatures polaire monotriche (vibrion) et polaire lophotriche (voir § 2.8.3.1.).
4. Déplacement en longs trajets rectilignes (monotriche) ou en courts trajets avec changements fréquents de direction (péritriche).

4. *Lactobacillus bulgaricus*

1. Voir chapitre II, § 2.2.3.3., *fig. II-17.*

2.1. Lysozyme : enzyme, osidase rompant les liaisons β1-4 des chaînes polyosidiques du peptidoglycane.

2.2. En eau distillée, milieu hypotonique, les bactéries traitées au lysozyme, privées de leur paroi, éclatent. Par osmose, l'eau pénètre dans le milieu intracellulaire, plus concentré.

2.3. En milieu isotonique, il y a équilibre osmotique, l'eau ne pénètre pas le milieu intracellulaire et, malgré la disparition de la paroi, les cellules n'éclatent pas, mais elles perdent leur forme de bacille et deviennent sphériques. On les appelle des sphéroplastes.

2.4. Rôle de résistance à la pression osmotique. Rôle dans la forme de la cellule.

5. Paroi bactérienne

1.1. et 1.2. Tube n° 1, cellules en milieu hypertonique (saccharose), plasmolyse ; membrane rétractée et détachée de la paroi qui reste en place du fait de sa structure rigide. Tube n° 2, cellules en milieu hypotonique (ED), membrane et paroi adjacentes.

2.1. Tube n° 1, cellules conservées mais sous forme de protoplastes. Tubes n° 2, cellules lysées.

2.2. Enzyme pariétolytique par dégradation du peptidoglycane (voir chap. II, § 2.2.4.).

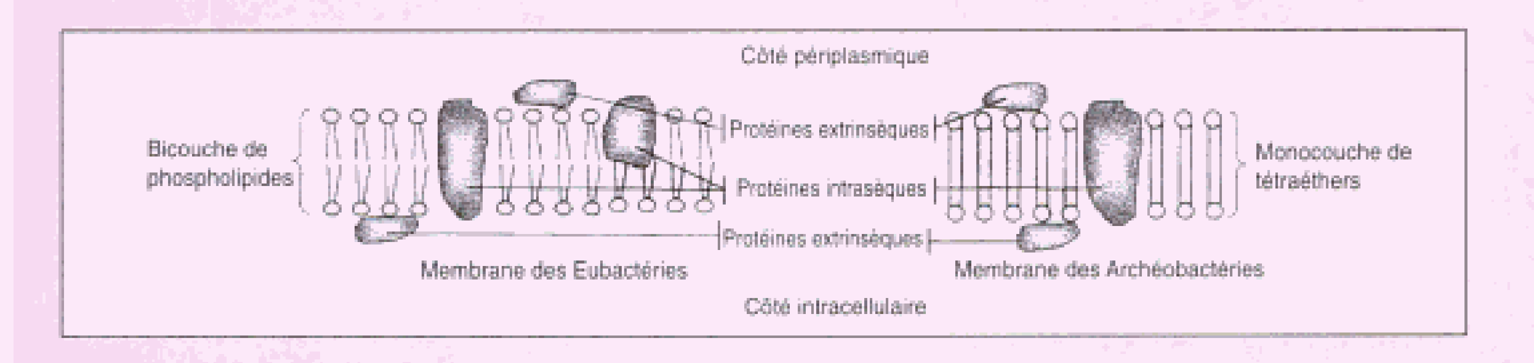
2.3. Dans le tube n° 1, la concentration élevée en saccharose assure un équilibre avec le milieu intracellulaire. Sans paroi, ces cellules perdent leur forme et deviennent sphériques. Dans le tube n° 2, l'hypotonicité due à l'ajout d'eau distillée provoque une cytolyse, la paroi n'empêchant plus la cellule d'éclater.

3. Car ils ne possèdent pas de paroi (voir chap. II, § 2.2.6.).

6. Achéobactéries

1. Un antibiotique à noyau β-lactame a pour particularité de présenter une analogie structurale avec un intermédiaire du métabolisme du peptidoglycane, le dipeptide Dala-Dala. l'acide et, donc, il inhibe ainsi la biosynthèse de la paroi chez la plupart des bactéries. Dans le cas des archéobactéries, ces acides aminés sont de la série L. La synthèse de la paroi de ces bactéries n'est ainsi pas inhibée par les antibiotiques à noyau β-lactame.

2. Analogies : deux extrémités hydrophiles et chaînes hydrophobes internes. Différences : bicouche « soudée » chez les archéobactéries, liaison « éther » et non « ester », acides gras ramifiés et « non saturés ». Structure très rigide à température ordinaire, mais souple sans déstructuration à température élevée.



7. Aspects structuraux de *Cl. tetani*

1.1. Suspension A : 1) spore terminale ; 2) spore libre ; 3) cellule végétative = bactérie non sporulée. Suspension B : 4) bactérie non sporulée.

1.2. Sporulation : division asymétrique par un septum transversal, séparation « préspore-sporange ». Synthèse de diverses enveloppes (paroi sporale, cortex, tunique interne et externe, exosporium) (voir chap II, § 2.9.2.1.).

2.1. Spores à propriété de thermorésistance, due à la structure multimembranaire, à la déshydratation et à la présence de dipicolinate de calcium (voir chap. II, § 2.9.3.1.).

2.2. Phénomène de germination. La spore retrouve des conditions normales de croissance, une forme végétative réapparaît laquelle reprend son cycle de division et donne une colonie après incubation (voir chap. II, § 2.9.4.).

8. *B. subtilis*

1.1. a) Paroi. b) Membrane cytoplasmique. c) Cytoplasme.

1.2. Peptidoglycane (mucocomplexe ou muréine). Chaînes oligosidiques (acide N-acétylmuramique β1-4 N-acétylglucosamine). Tétrapeptide lié à l'acide N-acétylmuramique. Pontages interchaînes par l'intermédiaire de ces tétrapeptides (liaison directe ou par peptides intermédiaires). Voir chap II, § 2.2.3.1. et *fig. II-15*.

2.1. Dégradation du peptidoglycane par rupture des liaisons β1-4. La première suspension, perdant sa paroi par destruction du peptidoglycane, se retrouve en milieu hypotonique (eau) et, par phénomène d'osmose, gonfle (turgescence) puis éclate (cytolyse). La seconde suspension, en milieu saccharosé, n'est pas lysée car le saccharose extérieur réalise l'équilibre osmotique avec le milieu intracellulaire. Seule la forme bacillaire est perdue car la paroi a disparu.

2.2. La cellule bactérienne perd sa paroi et prend une forme sphérique, le protoplaste.

2.3. Rôle de résistance à la pression osmotique.

2.4. Cet antibiotique agit sur la biosynthèse de la paroi (voir chap. II, § 2.2.5.) et non sur sa structure. Activité bactériostatique sur les cellules en division qui ne peuvent synthétiser la nouvelle paroi pour chacune des deux cellules filles (voir chap. V, § 4.3.2.1.). Le lysozyme, pour sa part, en détruisant la paroi provoque la cytolyse, effet bactéricide.

9. Étude de l'action du lysozyme sur *L. monocytogenes*

1. Phase 1 = phase de latence, nombre de bactéries constant, essentiellement phase d'adaptation enzymatique au milieu. Phase 2 = phase exponentielle, augmentation du nombre de bactéries de manière exponentielle, LnN proportionnel au temps, phase de croissance la plus rapide (G minimum et μ_x maximum dans les conditions utilisées = taux de croissance μ_{xexpo}). Phase 3 = phase stationnaire, N constant et maximum, autant de cellules qui meurent que de cellules qui apparaissent, milieu épuisé. Phase 4 = phase de déclin, N diminue, autolyse cellulaire (voir chap. III, § 3.2.).

2. Courbe L : addition de lysozyme en phase exponentielle, lyse cellulaire rapide et destruction totale de la population. Courbe L': même phénomène.

3. L'action du lysozyme est indépendante de la phase de croissance, donc des conditions dans lesquelles se trouvent les cellules (milieu, division, etc.). Cette enzyme agit sur une structure de la paroi, le peptidoglycane, vitale pour la cellule. En détruisant le peptidoglycane, la paroi est détruite et les cellules meurent par cytolyse (effet bactéricide).

10. Structure des salmonelles et rôle dans leur classification

1.1. Schéma d'une cellule bactérienne sans capsule (voir chap. II, *fig. II-4*). Compléter par un schéma détaillé de la paroi montrant le LPS, les porines, les lipoprotéines, la membrane externe (voir chap. II, *fig. II-18*). La seule différence entre les salmonelles se situe dans la nature des sucres du lipopolysaccharide O et de la flagelline.

1.2. Antigènes somatiques ou antigènes O, nature des désoxyoses au niveau du LPS. Antigènes flagellaires ou H, séquence des acides aminés constituants la flagelline (voir chap. II, § 2.2.4.1.2. et 2.8.3.1.).

2.1. Suivi de l'évolution d'une infection au niveau ethnologique et géographique afin de connaître ses conditions d'apparition et d'évolution (voir chap. VII, § 3.7.).

2.2. Classification par groupe selon la fréquence de certains antigènes O, puis classification plus fine selon les autres antigènes O et les antigènes H (voir chap. II, § 2.2.4.1.2. et tab. II-3).

11. Éléments de structure cellulaire

1. Ribosomes : petites structures globulaires très denses aux électrons (de 10 à 30 nm) répandues dans tout le cytoplasme. Appareil nucléaire : chromosome unique circulaire se présentant sous forme d'un filament circulaire très dense aux électrons, plus ou moins torsadé.

Ribosomes : responsables de la synthèse des protéines (traduction). Appareil nucléaire : responsable de la conservation et de la transmission du patrimoine génétique de la cellule à sa descendance, sert aussi de matrice pour la synthèse d'ARN.

2.1. Il n'est pas entouré d'une enveloppe nucléaire comme chez les eucaryotes.

2.2. Circulaire, constitué d'ADN (voir Biochimie et chap II, § 2.5.2.) et de protéines basiques lui donnant une structure de type nucléosome des eucaryotes (voir chap. II, § 2.5.6.1.).

2.3. Mode semi-conservatif (chaque brin parental sert de matrice à la synthèse d'un nouveau brin et forme avec lui une des molécules filles). Expérience de Meselson et Stahl (voir chap. II, § 2.5.5.).

2.4. Porte l'information génétique nécessaire à la cellule (enzymes, fonctions, régulations, caractères métaboliques…). Permet la conservation intégrale de ce patrimoine et sa transmission à la descendance lors de la division cellulaire.

12. Étude structurale de *B. subtilis*

1.1. Présence de spores intracellulaires. En 72 heures, le milieu s'est épuisé et les conditions de culture sont devenues plus difficiles, ce qui a déclenché le phénomène de sporulation.

1.2. Spore : membrane, paroi, cortex, tunique interne et externe, exopsorium (voir chap. II, § 2.9.1.).

Thermorésistance, résistance aux agents physico-chimiques (UV, X, ultrapressions), synthèses d'antibiotiques (voir chap. II, § 2.9.3.).

1.3. Durant les 24 heures de culture, les bactéries ont retrouvé des conditions idéales de croissance et se sont normalement développées. Le chauffage 10 minutes à 70 °C a activé la spore et déclenché le phénomène de germination qui redonne des cellules sous forme végétative aptes à se diviser (voir chap. II, § 2.9.4.).

13. Structure comparée des bactéries à Gram positif et négatif

1.1. Couche externe gélatino-muqueuse.

1.2. Nature polyholosidique.

1.3. Parce que cette capsule possède des spécificités antigéniques différentes selon la nature des constituants (polyholosidiques pour *S. pneumoniae*).

1.4. Parce que cette structure leur permet de résister à la phagocytose.

2.1. Photo a : *Haemophilus influenzae*, paroi stratifiée mince (de 6 à 15 nm) des Gram négatif. Photo b : *Streptococcus pneumoniae*, paroi homogène plus épaisse (18 à 80 nm) des Gram positif.

2.2. Noter la paroi, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme.

2.3. *Haemophilus influenzae* (Gram négatif) : peptidoglycane, LPS, lipoprotéine, porines. *Streptococcus pneumoniae* (Gram positif) : peptidoglycane, acides teichoïques (voir chap. II, § 2.2.3.1. et 2.2.3.).

Copyrighted material

Chapitre 3

Nutrition et croissance des bactéries et des champignons

Une bactérie comme *E. coli* croît et se divise en 20 à 30 minutes pour donner naissance à deux bactéries qui hériteront, de la cellule mère, le même potentiel d'activité, les mêmes structures complexes et le même impérieux besoin de division.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier le mode de multiplication des micro-organismes et, plus particulièrement, de rechercher dans quelles conditions la cellule bactérienne se forme, se développe, croît, vit et se reproduit, puis dépérit et meurt. Les connaissances acquises auront de larges applications dans tous les domaines de la bactériologie et de la microbiologie industrielle.

La **nutrition** doit être satisfaite par deux types de substances (nutriments) que le micro-organisme doit trouver dans son environnement (naturel ou milieu de culture) : les substances élémentaires, c'est-à-dire les matériaux constitutifs de la cellule – carbonés, azotés, minéraux, et les substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses propres constituants. Pour étudier la nutrition, nous analyserons les besoins élémentaires et énergétiques nécessaires à la croissance des micro-organismes, de même que les facteurs physico-chimiques qui la conditionnent. La connaissance de ces besoins et de ces conditions conduit en pratique à la réalisation de cultures aux multiples variantes.

La **croissance** peut être définie comme « un accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme ». Chez les micro-organismes unicellulaires, elle aboutit non pas à une augmentation de taille comme chez les organismes pluricellulaires mais à une augmentation du nombre des cellules. L'évolution de la croissance est suivie en milieu liquide par l'augmentation de la masse vivante (**biomasse**). Elle peut être décomposée en un certain nombre de phases définies par rapport à des paramètres, dits **paramètres d'état** : la vitesse spécifique maximale de croissance ou taux de croissance et le temps de génération.

Les micro-organismes se multiplient à partir des aliments ou **nutriments** présents dans les milieux de culture. Ils ont tous un certain nombre de besoins communs : nécessité d'eau, de source d'énergie, de source de carbone, de source d'azote et d'éléments minéraux. Ces besoins de base sont appelés **besoins élémentaires**. Beaucoup d'entre eux, dans ces conditions, peuvent croître et se multiplier. Certains autres, pourtant, en sont incapables : un ou plusieurs constituants essentiels, nécessaires à la synthèse d'un composant indispensable à la vie cellulaire, leur font défaut. Ces constituants ou métabolites essentiels doivent leur être fournis pour assurer leur développement. Ces besoins spécifiques sont appelés **facteurs de croissance**.

Selon la nature de ces besoins, on sera amené à définir des catégories de micro-organismes que l'on appelle des **types trophiques** (du grec *trophus* : nourriture).

Copyrighted mater

1.1. Besoins élémentaires

1.1.1. Source d'énergie

Selon le type d'énergie utilisée, on peut reconnaître deux catégories de micro-organismes :

– les **phototrophes**, ou photosynthétiques, qui puisent leur énergie dans le rayonnement lumineux ;

– les **chimiotrophes**, ou chimiosynthétiques, qui utilisent l'énergie de l'oxydation de produits chimiques organiques ou minéraux.

La photosynthèse est le mode de vie caractéristique des végétaux, des algues bleu-vert et de quelques espèces bactériennes. Dans chaque cas, grâce à l'énergie lumineuse, le processus conduit à la synthèse d'ATP aux dépens de l'ADP et du phosphate inorganique. Les mécanismes sont pourtant distincts selon qu'il s'agit des végétaux ou des bactéries (voir chap. IV).

La phototrophie bactérienne peut faire appel à des composés minéraux ou organiques comme source d'électrons. On parlera donc de bactéries **photolithotrophes** dans le premier cas, bactéries capables de se développer dans un milieu purement minéral comme le font les végétaux : ce sont les bactéries sulfureuses pourpres *(Thiorhodaceae)* ou vertes *(Chlorobacteriaceae)*. Dans le second cas, il s'agira de bactéries **photo-organotrophes** qui nécessitent des composés organiques comme sources d'électrons : telles sont les bactéries pourpres non sulfureuses *(Athiorhodaceae)*. Il est habituel de procéder de la même façon pour classer les bactéries chimiotrophes ou chimiosynthétiques. Elles puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Elles font appel, pour cela, à des composés « donneurs d'hydrogène ou d'électrons » et, corrélativement, à d'autres composés « accepteurs d'électrons ». En considérant la nature de ces substances, il est possible d'établir une classification parfaitement rationnelle : si le donneur d'électrons est un corps minéral, on parlera de bactérie **chimiolithotrophe** ; s'il est organique, la bactérie est **chimio-organotrophe**. La grande majorité des bactéries entre dans cette dernière catégorie ; bactéries pathogènes ou ayant un intérêt médical, bactéries de contamination alimentaire, bactéries utilisées dans l'industrie pour leur synthèse d'antibiotiques, de vitamines, d'acides aminés, etc. Les bactéries chimiolithotrophes forment un groupe plus restreint intervenant au cours des cycles de la matière vivante dans le sol et dans les eaux : bactéries oxydant l'hydrogène *(Hydrogenomonas)*, bactéries oxydant l'ammoniaque *(Nitrosomonas)* ou les nitrites *(Nitrobacter)*, bactéries oxydant les composés réduits du soufre *(Thiobacteriaceae, Thiobacillus)*, etc.

On appelle aussi **paratrophes** les bactéries intracellulaires comme les rickettsies et les chlamydies qui tirent leur énergie de leur parasitisme obligatoire.

1.1.2. Source de carbone

Le carbone est l'élément constitutif essentiel de la cellule (50 % chez *E. coli*) et doit être fourni en quantité suffisante. L'utilisation de milieux chimiquement définis a permis de connaître les substances qui peuvent servir de source de carbone.

Ces exigences nutritionnelles conduisent à envisager deux grandes catégories de micro-organismes. Les uns, **autotrophes**, sont capables de se développer en milieu inorganique contenant le CO_2 comme seule source de carbone. Les autres, **hétérotrophes**, exigent au contraire des composés organiques pour se reproduire. Cette distinction, qui ne suffit pas à englober tous les types nutritionnels précédemment définis, reste traditionnelle et utile. Le plus simple des composés carbonés est le dioxyde de carbone ou CO_2. Les bactéries photosynthétiques et la plupart des chimiolithotrophes peuvent l'utiliser comme seule source de carbone (autotrophes). Son rôle, bien moins évident, est tout aussi important chez les hétérotrophes : son absence empêche la croissance de nombreuses espèces telles *S. typhi*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *C. diphteriae*, etc. Une atmosphère enrichie en CO_2 favorise celle de

Copyrighted material

Brucella abortus. Le mécanisme de ce pouvoir stimulant n'est pas parfaitement clair ; le CO_2 serait nécessaire à la synthèse de certains métabolites essentiels, synthèse qui fait intervenir une réaction de carboxylation. En voici un exemple :

$$CO_2 + CH_3\text{-CO-COOH} \rightarrow \text{HOOC-}CH_2\text{-CO-COOH}$$

acide pyruvique — acide oxaloacétique

Les hétérotrophes peuvent dégrader une immense variété de substances hydrocarbonées : les unes, des molécules simples comme l'alcool, l'acide acétique et l'acide lactique ; d'autres, plus complexes, comme les sucres ou les polyholosides.

Certains *Pseudomonas* par exemple, peu exigeants, utilisent une grande variété de sucres comme unique source de carbone. D'autres espèces, au contraire, ont des exigences plus strictes et ne dégradent que certains composés carbonés : *Micrococcus glycinophilus* nécessite, pour sa croissance, le seul glycocolle, et *Ps. methanica* le méthane ou le méthanol.

1.1.3. Soufre et phosphore

Parmi les constituants minéraux de la bactérie, le soufre et le phosphore tiennent une place de choix. Le premier est présent dans certains acides aminés et donc dans les protéines sous forme de groupements thiols (–SH). Il est principalement incorporé sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques, rarement sous forme de soufre réduit. Le second fait partie des acides nucléiques, de nombreuses coenzymes et de l'ATP. Il est incorporé dans la cellule sous forme de phosphate inorganique.

1.1.4. Source d'azote

Pour synthétiser leurs protéines, qui représentent environ 10 % de leur poids sec, les micro-organismes ont besoin de substances azotées. Quelques bactéries seulement sont capables de fixer l'azote sous sa forme la plus simple, c'est-à-dire l'azote moléculaire. Tel est le cas des *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec certaines légumineuses en leur permettant de fixer l'azote atmosphérique. De la même façon, les lichens sont le résultat d'une symbiose algue-champignon et, parmi eux, quand l'algue est une cyanobactérie, elle est fixatrice d'azote (genres *Nostoc* essentiellement). La fixation d'azote moléculaire peut également être le fait de bactéries « libres » tels les *Azotobacter* et certains *Clostridium* qui, de ce fait, contribuent à fertiliser le sol.

D'autres composés inorganiques peuvent être utilisés : les nitrites par les *Nitrobacter*, les nitrates par de nombreux groupes (ils sont alors réduits en nitrites puis en ammoniums), l'ammoniac par certaines espèces, sous forme de sels d'ammonium (il est alors assimilé *via* l'acide glutamique).

La source d'azote peut enfin être organique : avec les groupements amines des composés organiques $R\text{-}NH_2$, c'est soit l'ammoniac qui est incorporé après désamination, soit le radical NH_2 par transamination.

1.2. Autres éléments minéraux

Certains de ces éléments jouent sans aucun doute un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. Ce sont notamment le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore. Ils sont souvent appelés **microéléments** (par opposition aux **macroéléments** précédents).

D'autres, beaucoup plus nombreux, sont partie constituante d'une enzyme ou d'une coenzyme, tels le fer des cytochromes et le magnésium de la chlorophylle. Outre les éléments déjà cités, le calcium, le magnésium, le cobalt, le cuivre, le manganèse, le molybdène et le vanadium jouent le rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques. On les appelle fréquemment des **oligoéléments** car ils sont indispensables en quantités infimes, le plus souvent apportés sous forme de traces par les produits chimiques qui servent à préparer les milieux de culture. Les *Lactobacillus*, par exemple, exigent des ions Mn^{++} et Mg^{++} pour se développer convenablement.

Quelques-uns de ces ions sont exigés à des taux définis pour l'élaboration d'une substance : la production de la toxine diphtérique est optimale à la concentration de 0,14 $mg \cdot L^{-1}$ de fer ; elle est pratiquement nulle lorsque celle-ci atteint 0,5 $mg \cdot L^{-1}$. Nous avons déjà appris que la thermorésistance de la spore est sous la dépendance

Copyrighted material

étroite du calcium, la synthèse des antibiotiques exige des ions minéraux (la pénicilline demande du fer, du soufre, du phosphore), l'élaboration des pigments par les bactéries dites pigmentées est strictement régie par ces éléments (celle, par exemple, de *Serratia marcescens* l'est par le fer et le magnésium).

1.3. Besoins spécifiques : facteurs de croissance

En complément de ces éléments de base, certaines bactéries exigent pour leur développement la présence de substances organiques qu'elles sont incapables de synthétiser et qu'on appelle **facteurs de croissance**.

La notion de facteur de croissance est à rapprocher de celle de métabolites essentiels. Ces derniers sont aussi des composés organiques qui proviennent d'une chaîne de biosynthèse et qui sont strictement nécessaires au développement de la bactérie. Ils sont synthétisés par elle. Dans le cas contraire, on doit les lui fournir par un apport extérieur : c'est alors qu'on parle de facteurs de croissance.

En fonction de ces besoins, on a l'habitude de classer les micro-organismes en deux catégories : les **prototrophes** qui ne nécessitent pas de facteurs de croissance, les éléments habituels déjà cités leur étant suffisants, et les **auxotrophes** qui les exigent.

Un exemple simple nous permettra de mieux interpréter ces différences : dans un milieu contenant une source de carbone comme le glucose, une source d'azote et des sels minéraux, *E. coli* se développe normalement ; *Pr. vulgaris*, une autre entérobactérie, en est totalement incapable à moins que l'on ajoute à ce milieu une faible quantité de nicotinamide. Cette substance, indispensable aussi bien à *E. coli* qu'à *Pr. vulgaris*, est synthétisée chez la première et non chez la seconde. Le nicotinamide est un métabolite essentiel pour les deux espèces et un facteur de croissance pour le seul *Proteus*. Certains auxotrophes n'exigent donc qu'un seul facteur de croissance. À l'opposé, d'autres en nécessitent un très grand nombre : certains *Lactobacillus* ont besoin que quelque 18 acides aminés leur soient fournis.

Les bactéries prototrophes, elles, sont capables de cultiver sur un milieu qu'on appelle **milieu minimum**, qui ne contient que les éléments essentiels *(tab. III.1)*.

Tableau III.1 – Exemple de composition d'un milieu minimum (en $g \cdot L^{-1}$ d'eau distillée).

Glucose	1
PO_4HK_2	10,5
PO_4H_2K	3,5
$ClNH_4$	0,5
SO_4Mg. 7 H_2O	0,05
SO_4Fe, 7 H_2O	0,005
Cl_2Na, 2 H_2O	0,05
Cl_2Mn, 4 H_2O	0,005

1.3.1. Nature et propriétés

Les facteurs de croissance englobent trois catégories de substances : les acides aminés, les bases puriques et pyrimidiques et les vitamines. Dans le *tableau III.2*, nous avons voulu rappeler les plus connus d'entre eux ainsi que les espèces bactériennes correspondantes.

On devine que les acides aminés sont des facteurs de croissance parce qu'ils sont indispensables à la synthèse des protéines. Les bases puriques et pyrimidiques font elles-mêmes partie des acides nucléiques et sont ainsi nécessaires à leur élaboration. Le rôle des vitamines, moins évident à première vue, est aujourd'hui parfaitement connu. Ce sont soit des coenzymes, soit des précurseurs de coenzymes. Leur absence prive la bactérie de la fonction correspondante : le nicotinamide est un des éléments de la molécule de NA D^+, un des plus importants transporteurs d'électrons ; le PAB fait partie intégrante de l'acide folique, une vitamine du groupe B qui intervient sous forme de coenzyme dans la synthèse des acides nucléiques.

Le premier des caractères communs des facteurs de croissance est leur action à des concentrations infimes ; elle est de l'ordre de 1 à 24 $\mu g \cdot L^{-1}$ pour les vitamines, de 10 $mg \cdot L^{-1}$ pour les bases puri-

Copyrighted material

Tableau III.2 – Principaux facteurs de croissance microbiens.

Facteurs de croissance		Fonction ou coenzyme	Organismes auxotrophes
Bases puriques ou pyrimidiques	Adénine Guanine Uracile Thymine	constituants des ac. nucléiques	*L. plantarum* *L. casei*
Acides aminés	Acide glutamique Lysine Arginine Tryptophane Tyrosine	constituants des protéines	*L. arabinosus* *S. typhi*
Vitamines	B_1 - Thiamine	cocarboxylase *(TPP)*	*St. aureus* *L. fermenti*
	B_2 - Riboflavine	FMN, FAD	*L. casei* *Str. hemolyticus* *Cl. tetani*
	B5- Acide pantothénique	coenzyme A	*lactobacillus* *Pr. morganii* *Zymomonas mobilis*
	B_6 - Pyridoxal	pyridoxal-phosphate	*L. casei* *Str. faecalis*
	B_{12} - Cobalamines		*L. lactis* *L. lichmanii* *Euglena gracillis* *Ochromonas sp.*
	PP - nicotinamide	pyridine-nucléotides	*Y. pestis*
Vitamines	Acide nicotinique	pyridine-nucléotides	*Pr. vulgaris* *L. arabinosus*
	Acide pimélique	biotine	*diphteriae*
	Acide folique	formylations	*casei* *faecalis*
	Acide para-amino-benzoïque	acide folique	*Cl. acetobutylicum* *Cl. tétanomorphum* *Acetobacter suboxydans*
	Acide lipoïque	transporteur d'électrons	*L. casei* *L. delbruckii* *Cl .tetani*
	Biotine	« coenzyme R » (carboxylations)	*L. arabinosus* *Rhizobium trifolii* Streptocoques *Sc. cerevisiae* et autres levures
	Choline	synthèse des phospholipides	Pneumocoque type III
	Hème (facteur « X »)	synthèse des hémoprotéines	*H. influenzae* *H. canis*
	K_3 - Ménadione	transporteur d'électrons	*M. paratuberculosis*

ques et de 25 $mg \cdot L^{-1}$ pour les acides aminés. Lorsqu'un facteur de croissance n'est présent qu'en faible quantité dans le milieu, il limite la croissance : on dit qu'il est un **facteur limitant** de la croissance (d'autres substrats, comme le glucose, peuvent aussi le devenir s'ils ne sont disponibles qu'en faible quantité et que, de ce fait, ils limitent la croissance sans être pour autant des facteurs de croissance).

Le second de leurs caractères est leur étroite spécificité. Reprenons l'exemple déjà cité du nicotinamide. Le simple changement de position du groupement CO-NH_2 sur le noyau benzénique ou son remplacement par un autre groupement proche COOH ou CH_3 lui enlève toute son activité.

Un autre exemple, celui de l'acide para-aminobenzoïque (PAB), conduit à une notion nouvelle, celle d'**antimétabolite**. Le PAB est un facteur de croissance pour certains mutants d'*E. coli*. Une autre substance de structure apparentée, le para-aminobenzène sulfanylamide, non seulement n'est plus un facteur de croissance pour la bactérie mais inhibe son développement, même en présence de PAB. En raison de son analogie de structure (analogue structural) *(fig. III.1)*, il entre en compétition avec le PAB et empêche le développement de cet *E. coli*. À de tels composés on donne le nom d'antimétabolites.

1.3.2. Dosage microbiologique

La croissance d'un micro-organisme exigeant un facteur donné peut être proportionnelle à la concentration de ce facteur. Ce rapport est rigoureusement fixe dans certaines limites de concentration. Sa connaissance permet alors le **dosage des facteurs de croissance** par voie microbiologique. À l'aide d'une solution de facteur de croissance de concentration connue, on réalise un étalonnage en suivant la croissance (turbidimétrie)

Copyrighted material

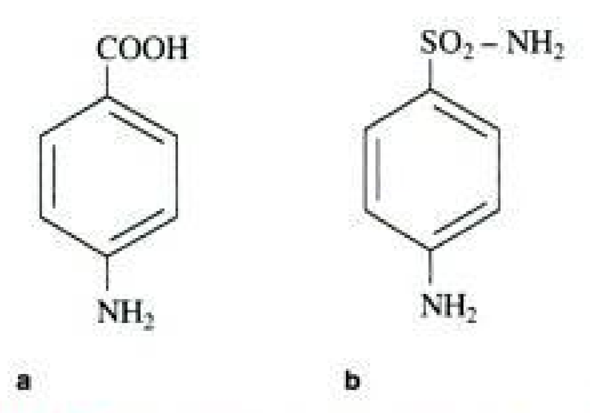


Figure III.1 – Analogie structurale entre l'acide para-aminobenzoïque (a) et le para-aminobenzène sulfanylamide (b).

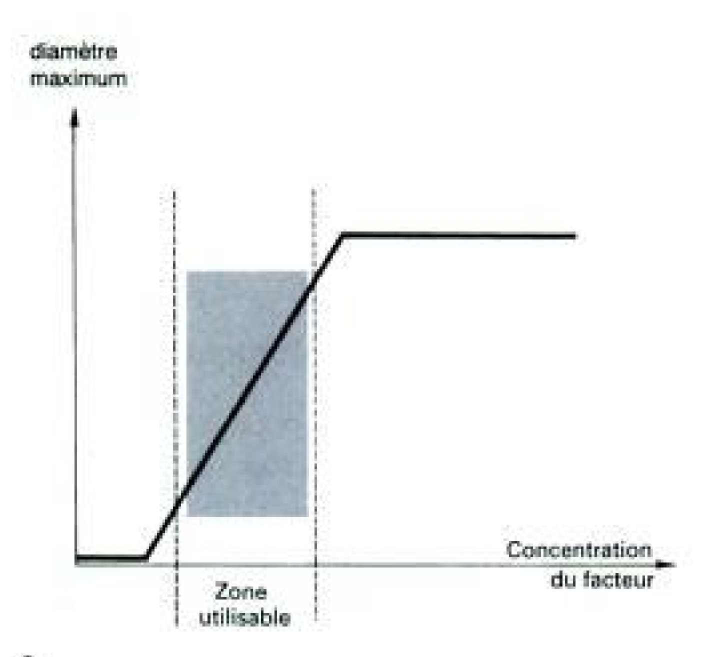
d'une souche test auxotrophe pour ce facteur. La zone de proportionnalité (zone utilisable) servira à déterminer la concentration d'une solution inconnue. Cette technique peut être réalisée également en milieu solide à l'aide de disques préimprégnés, et l'on mesure alors le diamètre maximal de culture (*fig. III.2*).

1.3.3. Phénomène de syntrophie

Les besoins en facteur de croissance d'une espèce microbienne peuvent quelquefois être satisfaits par la présence d'une autre espèce qui précisément synthétise ledit facteur. Ce phénomène d'interaction métabolique est connu sous le nom **syntrophie** (= repas avec). Il est illustré par l'existence de colonies satellites qui, fréquemment, sur milieu solide comprenant un mélange de germes, viennent se développer au voisinage d'une colonie productrice de vitamines (*fig. III.3*). La propriété de syntrophie peut être utilisée dans un but diagnostique. *H. influenzae* nécessite, pour sa croissance, les facteurs X et V : pour isoler cette bactérie d'un produit pathologique, on utilise un milieu qui contient le facteur X, le facteur V est produit par des *Staphylococcus* qui sont cultivés en surface. D'autres relations peuvent exister entre les micro-organismes. Elles sont résumées dans le *tableau III.3*.

1.4. Facteurs physiques

Les nutriments constitutifs ou énergétiques nécessaires à un micro-organisme pour son développement doivent lui être apportés dans certaines conditions d'environnement. Un certain nombre de facteurs physiques interviennent au cours de la nutrition. Ils peuvent l'empêcher, l'inhiber ou la favoriser.



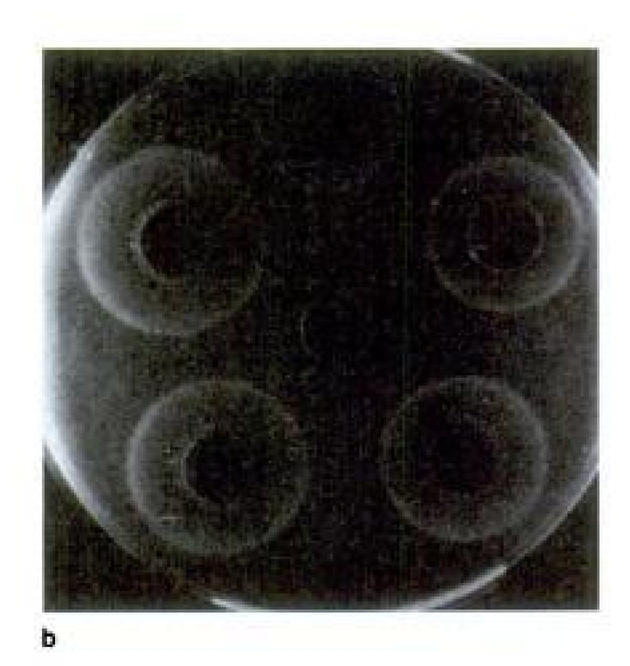


Figure III.2 – Dosage microbiologique des facteurs de croissance.
a : droite de référence ; b : dosage de la vitamine B_{12} en milieu solide.

Copyrighted material



Figure III.3 – **Phénomène de satellitisme.**

Culture profonde en gélose gélatine ; grosse colonie : streptocoque ; petite colonie : bacille à Gram positif du genre *Corynebacterium*, microaérophile, × 5.

1.4.1. Température

Elle influence profondément la multiplication aussi bien que le métabolisme (action sur la vitesse des réactions chimiques et biochimiques). Selon la température optimale de développement, on distingue généralement trois catégories de micro-organismes :

– les **mésophiles** (méso = médian), préférant une température moyenne comprise entre 20 et 40 °C (optimum : 30-37 °C) ;

– les **psychrophiles** (psychro = froid), dont la température optimale de croissance est située aux environs de 10 °C, mais qui peuvent se développer à 0 °C (voire en dessous pour les **cryophiles**) ;

– les **psychrotrophes**, plus proches des mésophiles, ayant un optimum à 25 °C mais pouvant s'adapter à 0 °C ;

– les **thermophiles** (thermo = chaud) qui se multiplient préférentiellement entre 45 et 55 °C ;

– les **thermophiles extrêmes** (ou hyperthermophiles), ayant un optimum situé vers 70 °C ;

– les **thermotrophes**, qui se développent visiblement aux environs de 50 °C mais plus nettement à la température moyenne de 30 °C.

Cette classification n'a pas de limites strictes. Il peut exister des chevauchements d'un groupe à l'autre *(tab. III.4)*.

La majorité des micro-organismes sont des mésophiles. Les champignons et les levures sont des psychrotrophes mésophiles mais certaines levures se développent à 45 °C et d'autres à 1 °C (psychrophiles). Les bactéries pathogènes pour l'homme et l'animal, les flores bactériennes normales des cavités naturelles ou du revêtement cutanéomuqueux, les saprophytes de l'environnement impliqués dans les cycles de dégrada-

Tableau III.3 – **Types d'interactions entre deux micro-organismes A et B.**

Relation	Germe A	Germe B	Nature
Prédation	+	–	B détruit A pour se développer
Parasitisme	+	–	B se développe au détriment de A sans le détruire
Compétition	–	–	A et B s'inhibent par limitation de substrats
Amensalisme	–	0	B nuit à A, sans être influencé d'aucune manière
Neutralisme	0	0	A et B évoluent indépendamment
Syntrophie ou commensalisme	+	0	B est bénéfique à A, sans être influencé
Synergie ou protocoopération	+	+	A et B profitent l'un à l'autre, sans obligation
Symbiose ou mutualisme	+	+	A et B ont besoin obligatoirement l'un de l'autre

0 : neutre ; + : bénéfique ; – : néfaste.

Copyrighted material

Tableau III.4 – Classification des micro-organismes en fonction de leur température optimale de croissance.

Catégorie	θ minimale	θ optimale	θ maximale
Thermophiles extrêmes	> 50 °C	> 70 °C	> 80 °C
Thermotrophes	> 25 °C	35-50 °C	> 50 °C
Thermophiles	>25 °C	> 45 °C	> 50 °C
Mésophiles	5-10 °C	30-37 °C	40-43 °C
Psychrotrophes	– 5 °C	20-25 °C	35 °C
Psychrophiles	– 15 °C	5-10 °C	20 °C

tion de la matière vivante appartiennent aux mésophiles.

Les thermophiles sont principalement rencontrés dans les genres *Bacillus* et *Clostridium*. Ils sont naturellement présents dans les écosystèmes de l'eau, du sol, de l'air, mais aussi en milieu alimentaire comme les *Aspergillus*. Certains prolifèrent plus abondamment dans les biotopes qui leur sont favorables, par exemple les sources thermales. Ces facultés sont quelquefois exceptionnelles : ainsi en est-il de la découverte récente de bactéries vivant au fond de la mer, au contact de sources chaudes et supportant une température de 250 °C sous une pression de 265 atmosphères (par exemple, *Pyrodictium occultum*) *(tab. III.5)*. Ces espèces ont donc en plus la particularité de résister à des pressions très fortes. On leur donne pour cela le qualificatif de **barophiles**.

Les psychrotrophes ou les psychrophiles sont très largement répandues dans les milieux naturels. Ce sont principalement des bacilles à Gram négatif asporulés des genres *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* et *Aeromonas*. Ils peuvent contaminer et altérer dangereusement les produits biologiques (sang ou dérivés du sang) conservés à basse température, de même que les aliments congelés qui perdent alors leur valeur marchande (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, levures et moisissures).

Les conditions de température à respecter dans le domaine alimentaire (stockage, congélation-décongélation, etc.) pour éviter l'altération des produits revêtent donc une grande importance. Cet aspect sera envisagé au chapitre V.

1.4.2. pH

L'action du pH se situe à trois niveaux : le milieu, la perméabilité membranaire et l'activité métabolique. En effet, la disponibilité de certains nutriments (ions métalliques notamment) peut être modifiée par l'équilibre ionique, la synthèse d'ATP dépend étroitement des pompes ioniques (voir chap. II) et l'activité enzymatique est très sensible aux variations de pH.

Tableau III.5 – Température de croissance de quelques bactéries thermophiles en °C.

		Minimum	Optimum	Maximum
Eubactéries	*Bacillus stearothermophilus*	45	65	75
	Bacillus caldolyticus	45	72	78
	Thermus thermophilus	50	70	80-85
Archaéobactéries	*Methanothermus sociabilis*	65	88	97
	Thermoproteus tenax	70	88	97
	Sulfolobus acidocaldarius	60	80	90
	Pyrococcus furiosus	70	100	103
	Staphylothermus marinus	65	92	98
	Pyrodictium occultum	82	105	110

Copyrighted material

À l'opposé des moisissures et des levures qui préfèrent pour leur développement un pH acide (pH 3 à 6) et se développent même, pour certaines espèces, à pH 1,5-2 (tel *Sc. bailii*), les bactéries, elles, se multiplient plutôt en milieu neutre (pH 6,5 à 7,5). Pour la plupart d'entre elles, ces limites sont assez larges : *E. coli* se multiplie à partir de pH 4,4 jusqu'à pH 9. D'autres, au contraire ont une préférence marquée pour les milieux fortement acides ou basiques. *T. thiooxydans*, qui présente un pH optimal de croissance voisin de 2, est encore capable de se développer à pH 0, c'est-à-dire dans une solution normale d'acide sulfurique. Cette tolérance exceptionnelle est souvent rencontrée avec les moisissures (fourchette de 1,5-3,5 à 8-11). Les *Lactobacillus* exigent aussi un pH relativement bas, voisin de 6. Tous ces germes sont appelés **acidophiles**. Les *Vibrio* se reproduisent au pH optimal de 9. Cette propriété est mise à profit pour leur isolement sélectif à partir des milieux fortement contaminés comme les matières fécales ou les eaux résiduaires. On les appelle des **basophiles** ou **alcalophiles**.

Les milieux de culture usuels sont généralement aptes au démarrage de la croissance d'une bactérie donnée, mais le développement optimal de celle-ci est le plus souvent entravé par les modifications chimiques qui résultent de la dégradation du substrat et qui produisent des acidifications ou des alcalinisations importantes. Pour éviter ces brusques variations dans la concentration en ions hydrogènes, on a recours à des solutions tampons ou à des carbonates alcalins insolubles. Les tampons phosphates (K_2HPO_4 et KH_2PO_4) sont les plus utilisés parce qu'ils permettent de couvrir une large zone de pH autour de la neutralité. Les carbonates alcalins sous forme de craie en poudre ou de morceaux de marbre conviennent à un grand nombre de milieux. Ils neutralisent les métabolites acides en les transformant en sels de calcium.

Dans l'industrie agroalimentaire, on veillera aussi de très près aux variations de pH pouvant favoriser telle ou telle souche et, ainsi, provoquer l'altération des aliments (voir chap. V).

1.4.3. Oxygène

C'est surtout vis-à-vis de l'oxygène que les exigences gazeuses des micro-organismes sont précises : certains sont **aérobies stricts**, exigeant l'oxygène libre pour leur développement ; d'autres, **anaérobies stricts**, ne peuvent se multiplier qu'en l'absence d'oxygène libre (ne possédant ni catalase, ni superoxydédismutase ils sont incapables d'éliminer les deux produits d'oxydation que sont l'eau oxygénée et l'ion superoxyde qui sont toxiques pour la cellule) ; d'autres encore sont **aéro-anaérobies** ou **anaérobies facultatifs**, capables de croître avec ou sans oxygène libre ; d'autres enfin, les **microaérophiles**, ne se reproduisent qu'en présence d'une faible tension d'oxygène.

La *figure III.4* montre comment ces quatre types respiratoires peuvent être différenciés chez les bactéries.

On peut les mettre en évidence par ensemencement d'un milieu gélosé solide, en tube fin et profond dans lequel l'oxygène n'est présent qu'en surface, et sur une zone étroite d'environ 1 cm. Les aérobies stricts cultivent seulement en surface, les anaérobies stricts dans le fond, les aéro-anaérobies sur toute la hauteur et les microaérophiles dans une zone intermédiaire. On parle aussi de micro-organismes aérophiles pour désigner certains germes qui se développent, de préférence et avec une particulière intensité, à la surface des milieux liquides en formant un voile.

La culture des micro-organismes aérobies ne présente pas de difficulté puisqu'elle est réalisée à l'air libre. Celle des anaérobies nécessite des précautions spéciales. Les méthodes en usage (qui seront évoquées au § 4.2.3.) font intervenir l'une des particularités suivantes :

– l'absence d'oxygène libre dans la zone profonde d'un milieu solide ;

– l'addition de réducteurs à des milieux liquides ;

– l'élimination de l'oxygène du récipient où les milieux de culture sont déposés.

Les champignons sont, comme les algues, les plantes et les animaux, aérobies. Certaines levures cependant peuvent vivre sans d'oxygène et réalisent alors une fermentation. Des champignons

Copyrighted material

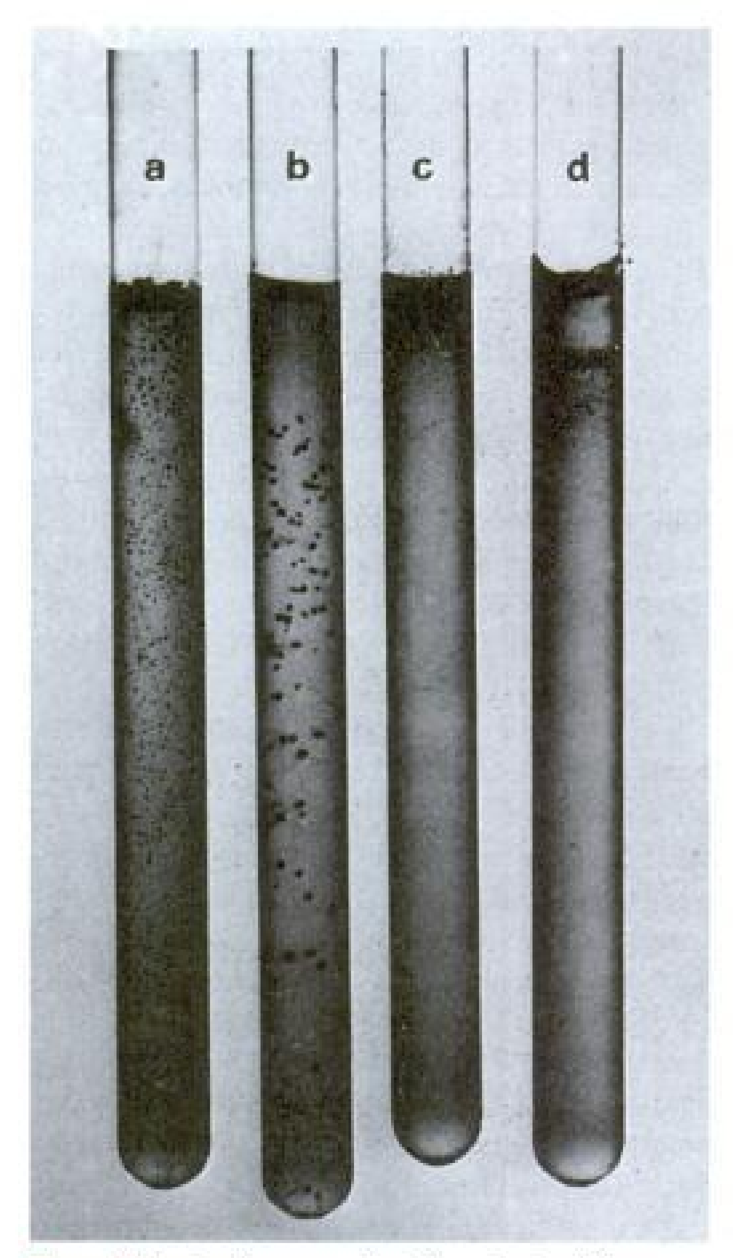


Figure III.4 – **Les types respiratoires des bactéries.**

a : bactérie aéro-anaérobie ; b : bactérie anaérobie stricte ; c : bactérie aérobie stricte ; d : bactérie micro-aérophile.

filamenteux comme *Pe. roqueforti* sont aérobies mais supportent des teneurs faibles en oxygène.

Les bactéries, elles, sont représentées dans toutes les catégories.

1.4.4. Pressions

1.4.4.1. Pression mécanique

La résistance des micro-organismes à la pression peut être spectaculaire. Les espèces **barophiles** supportent des fortes pressions (jusqu'à plus de 1 000 bars pour certaines comme *Str. faecalis*).

1.4.4.2. Pression osmotique

La plupart des bactéries sont pratiquement insensibles aux variations de pression osmotique. Elles sont protégées par leur paroi rigide. Cette paroi, lorsqu'elle est détruite par exemple par le lysozyme, libère les fragiles protoplastes : la pression intérieure de ces cellules est élevée ; elle doit être équilibrée par une pression extérieure égale, comme celle que peut fournir une solution de saccharose à 20 %, sinon les protoplastes éclatent.

Cette indifférence relative de la plupart des micro-organismes vis-à-vis de la pression osmotique n'est pas partagée par de nombreuses bactéries marines adaptées à un milieu contenant 35 g.L^{-1} de chlorure de sodium.

Selon leur sensibilité à la pression osmotique on distingue :

– les **non-halophiles** : croissance en milieu de concentration en NaCl inférieure à 0,2 M (entérobactéries, *Pseudomonas*...) ;

– les **halophiles**, nécessitant des concentrations de 0,2 M.L^{-1} pour les moins halophiles *(Ps. marina)* à 5,2 M.L^{-1} pour les **halophiles extrêmes** *(Halococcus morrhueae, Halobacterium salinarium) ;*

– les **halotolérants** comme *Staphylococcus*, certaines levures et moisissures, certains lactobacilles.

Le comportement des micro-organismes vis-à-vis de la pression osmotique est donc à considérer de très près, non seulement afin de pouvoir les cultiver, mais aussi dans le domaine des industries agroalimentaires, pour la mise au point de procédés permettant d'éviter la dégradation des produits et leur contamination (voir chap. V).

1.4.5. Humidité : Aw

L'eau est utilisée de deux manières par les micro-organismes : comme solvant des nutriments, permettant ainsi leur transport et leur disponibilité, et comme agent chimique des réactions d'hydrolyse.

La quantité d'eau disponible peut être chiffrée. On utilise généralement l'« activité de l'eau » ou Aw *(activity of water)* comme moyen d'expression quantitative de l'eau disponible. Elle est défi-

Copyrighted material

nie comme étant le rapport de la pression de vapeur saturante du milieu (solution, aliment, milieu de culture…) à la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température ($Aw = p/p_0$). Ce rapport, inférieur ou égal à 1 (1 correspond à la saturation en eau), peut être assimilé à l'humidité relative du milieu. Ainsi, dans une solution fortement osmotique, donc à proportion de soluté importante par rapport au solvant, l'Aw sera faible. Dans un aliment sec, contenant très peu d'eau (extrudé par exemple), ce sera également le cas. Le *tableau III.6* donne quelques valeurs d'Aw pour des solutions de NaCl et de saccharose.

Les micro-organismes exigent un certain seuil d'humidité. En réponse à un Aw faible, ils réagiront en ralentissant leur croissance. En effet une diminution d'Aw entraîne une plasmolyse cellulaire et donc une baisse de l'activité enzymatique. Ainsi *St. aureus* voit son taux de croissance réduit de 10 % pour un Aw de 0,9. Le *tableau III.7* donne quelques exemples de minima d'Aw.

Certains micro-organismes sont capables de s'adapter, tels *Micrococcus*, *Sarcina* ou *Staphylococcus*.

Ainsi, la **disponibilité de l'eau** est un facteur de réussite de la culture des micro-organismes et devra être prise en considération dans la confection des milieux de culture (voir § 4.1.2.). De même, le degré d'humidité des produits alimentaires aura une grande influence sur leur conservation et sur l'utilisation de techniques permettant d'éviter toute contamination du produit (produits déshydratés, lyophilisés, etc., voir chap. V). Les espèces **xérophiles** résistent à la dessiccation relative du milieu et poussent dans des conditions arides.

Tableau III.6 – **Valeurs d'Aw pour quelques solutions de NaCl et de saccharose.**

Aw à 25 °C	NaCl en g/100 g d'eau	Saccharose en g/100 g d'eau
0,99	1,75	11
0,96	7,01	25
0,94	10,34	93
0,92	13,50	120
0,90	16,50	144
0,85	23,60	208

Tableau III.7 – **Aw de quelques micro-organismes et aliments.**

Micro-organismes	Aliments
Acinetobacter (0,99)	Viandes (0,99)
Cl. botulinum (0,97)	Raisin (0,986)
Ps. fluorescens (0,957)	Pommes (0,98)
E. coli (0,95)	Cerises (0,977)
Salmonella spp (0,95)	Confiture (0,75-0,80)
St. aureus (0,86)	Céréales (< 0,70)
Bactéries halophiles (0,75)	Chocolat (< 0,60)
Sc. cereviseae (0,90-0,94)	
Levures halophiles (0,62)	
Fusarium (0,90)	
Mucor (0,80-0,90)	
Aspergillus flavus (0,78)	

2. Multiplication des bactéries et des champignons

2.1. Multiplication bactérienne

L'accomplissement du cycle de réplication du chromosome bactérien (voir chap. II) est immédiatement suivi par la division cellulaire lors de laquelle se forme un septum transversal de division. Il s'agit d'abord d'un allongement de la cellule suivi, à partir de la périphérie, d'une synthèse concomitante de membrane et de paroi *(fig. III.5)* aboutissant à un ensemble « membrane-paroi » interne, le septum *(fig. III.6)*, séparant ainsi les deux cellules filles. Celles-ci se séparent ou non (chaînettes de cocci *[fig. III.7]*, diplocoques, diplobacilles ; voir chap. II) mais présentent de toute façon une morphologie, une structure, des propriétés physico-chimiques et physiologiques totalement identiques à la cellule mère. Le processus dure environ une vingtaine de minutes chez *E. coli*.

Copyrighted material

a b c

Figure III.5 – **Division chez *Bacillus subtilis*.**

a, b, c, trois stades de la division × 18 000.

Figure III.6 – **Début de division chez *Bacillus subtilis*.**

× 40 000. Septum en formation *(Photo publiée avec l'aimable autorisation de Mme Ryter, Institut Pasteur)*.

Copyrighted material



Figure III.7 – **Streptocoques en division.**
Remarquer que le plan de division reste parallèle à lui-même, ce qui explique la formation de chaînettes.

Si nous partons donc d'une cellule unique, on aboutit à deux cellules filles qui vont chacune donner à leur tour deux autres cellules au cycle suivant et ainsi de suite. Il s'agit donc là d'une progression géométrique :

1 → 2 → 4 → 8 → 16, etc.

Le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser, difficilement déterminable, peut donc se matérialiser par le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules (doublement de population) ou de la biomasse : on le nomme **temps de génération** et on le note G. Il est caractéristique de l'espèce bactérienne considérée et dans les conditions optimales de croissance, il est d'environ :

- 10 minutes pour *V. parahaemolyticus ;*
- 20 minutes pour *E. coli ;*
- 100 minutes pour *L. acidophilus ;*
- 1 000 minutes pour *M. tuberculosis.*

On définit de même le **nombre de divisions** (de générations) par unité de temps qui est donc égal à l'inverse du temps de génération, soit 1/G. Pour les exemples donnés précédemment, il est égal à (en h^{-1}) :

- 6 pour *V. parahaemolyticus ;*
- 3 pour *E. coli ;*
- 0,6 pour *L. acidophilus ;*
- 0,06 pour *M. tuberculosis.*

Dans une population microbienne, toutes les cellules ne se divisent pas au même rythme ni présentent un synchronisme parfait. La croissance ne s'effectue pas « par paliers » mais, au contraire, de façon continue *(fig. III.8)*. On est en présence de **croissances asynchrones** et l'exploitation des courbes de croissance va s'en trouver compliquée. Les méthodes de mesure permettant de quantifier la croissance vont donc revêtir une grande importance. Selon le cas, on déterminera le nombre de cellules, la biomasse ou éventuellement l'évolution des métabolites (substrats, produits, constituants cellulaires).

2.2. Multiplication des levures

La reproduction végétative des levures se déroule généralement par **bourgeonnement**. Dans certaines conditions, une reproduction sexuée peut être induite avec établissement d'un cycle sporal.

2.2.1. Multiplication végétative asexuée

À l'exception de quelques genres, les **bourgeons** (blastospores)apparaissent dans des zones à proximité des extrémités des grands axes des cellules *(fig. III.9a)*. Certaines espèces de levures

Copyrighted material

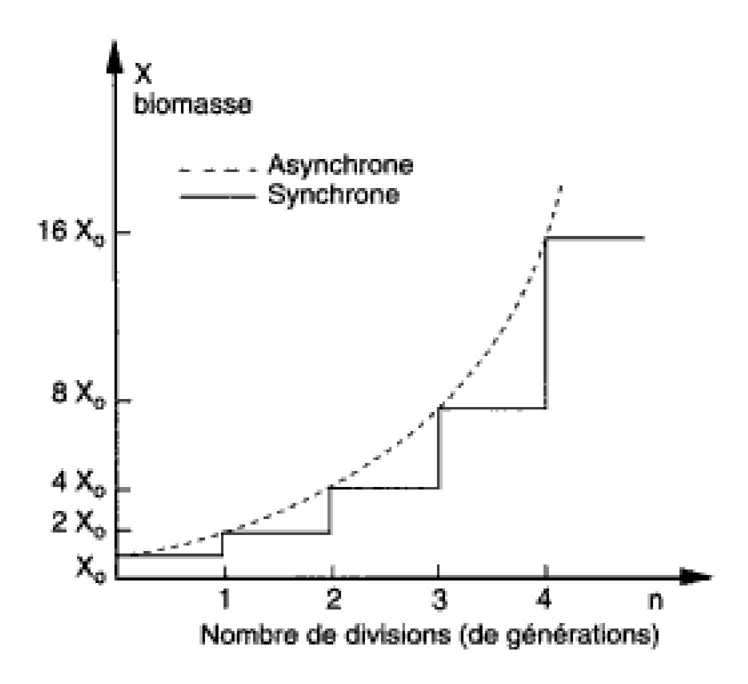


Figure III.8 – **Croissance synchrone, croissance asynchrone.**

sphériques sont caractérisées par un **bourgeonnement multilatéral**. Il ne se produit pas deux bourgeonnements au même site (exception faite du bourgeonnement bipolaire). Dans des conditions favorables, le temps de génération de *Sc. cereviseae* est de 1,5 à 2 heures, une cellule peut former environ 4 bourgeons.

2.2.2. Reproduction sexuée

Lorsque le milieu devient défavorable, les levures cessent de se multiplier par bourgeonnement et sporulent.

Les levures sont des eucaryotes diploïdes et donc présentent les caractéristiques de la division mitotique. Seule la membrane nucléaire persiste, ce qui aboutit à la formation d'une structure quadrilobée, l'**asque**, contenant 4 ascospores *(fig. III.9b)*.

Figure III.9 – **Reproduction d'une levure.**
a : multiplication végétative asexuée ; b : cycle sexué.

Copyrighted material

Les ascospores sont de deux types a ou α, chacun d'entre eux, après libération de l'asque, pouvant se développer en cellule haploïde par bourgeonnement.

L'accouplement d'une cellule a avec une cellule α conduit à la formation par fusion d'un zygote, cellule diploïde a α, qui peut à son tour se multiplier par bourgeonnement ou sporuler. Chez *Sc. cereviseae*, la formation du zygote demande de 6 à 8 heures et elle est spontanée sur milieu riche. Par contre, elle ne se produit qu'en carence azotée chez *Schizosaccharomyces pombe*.

Plusieurs facteurs influent sur la sporulation :

– l'**hétérothallisme** ; la sporulation n'a lieu que s'il y a réunion de types sexués opposés (« a α ») ;

– la composition du milieu : ainsi *Sc. cereviseae* a besoin d'une source de carbone non fermentescible et d'une concentration limitante en azote (milieu de Mac Clary) ;

– la diminution de l'oxygène dissous ;

– la température ; la plupart des espèces sont sporogènes entre 18 et 25 °C.

Certaines espèces (telle *Ca. albicans*) sont caractérisées par la formation de **chlamydospores** intercalaires ou terminales (ce sont des structures remplies de protoplasme et entourées d'une paroi épaisse).

2.3. Multiplication des moisissures

La multiplication végétative des champignons multicellulaires est caractérisée par le phénomène d'« envahissement » que l'on peut observer macroscopiquement ; par exemple lorsque l'on abandonne un morceau de pain humide, il se forme alors en surface des couches circulaires de moisissure. Elles apparaissent à la suite du dépôt d'une spore transportée par l'air. D'autre part, il existe aussi une reproduction sexuée également par l'intermédiaire de spores. Enfin, la survie peut être encore assurée par les **chlamydospores**.

2.3.1. Cycle asexué

La structure végétative ramifiée, le **mycélium**, est obtenue à partir d'une spore par bourgeonnement dans toutes les directions qui donne des filaments ramifiés ou **hyphes** *(fig. III.10a)*. La croissance hyphale est strictement apicale. Elle se réalise par lyse de la paroi apicale suivie de synthèse de matériel nouveau. Pour cela, l'apex est enrichi en vésicules, souvent dérivées de l'appareil de Golgi et du réticulum, qui apportent les enzymes nécessaires. Si ces apports sont trop importants (milieu riche), l'hyphe se ramifie, des ramifications latérales apparaissent à quelques dizaines ou centaines de micromètres de l'apex. C'est ce phénomène qui conduit à l'envahissement observé macroscopiquement et qui peut atteindre 5 cm par jour chez le *Rhizopus*.

Lorsque le mycélium s'est développé, il élabore des ramifications plus rigides et spécialisées, les **sporophores**, qui vont élaborer des **spores** par division du noyau cellulaire. Ces spores naissent à l'extrémité et se disposent en longues chaînes (**conidies** des *Penicillium*) ou sont enfermées dans une sorte de sac, le sporange (sporangiospores des *Rhizopus*). À maturité, disséminées par le vent, les **conidies** et les **sporangiospores**, si elles tombent sur un substrat favorable, germent et forment un nouveau mycélium. L'aspect et la structure des sporophores sont très variables et ils constituent une des bases de la classification des moisissures. Ils donnent notamment l'aspect et la couleur caractéristiques de l'envahissement des cultures : blanc, bleu, vert, rouge, marron ou noir.

Ce cycle est très rapide. On a pu calculer qu'une seule spore germant à 25 °C pouvait produire 100 000 spores dès le deuxième jour et 12 millions 24 heures après !

2.3.2. Cycle sexué

Certaines moisissures sont aptes à produire des organes de reproduction sexuée *(fig. III.10b)*. Nous nous limiterons à l'exemple des ascomycètes. À la suite de la méiose, le mycélium élabore des structures porteuses de gamètes constituées de deux entités : une **anthéridie**, porteuse des noyaux « + », et un **ascogone**, contenant des noyaux « – ». Les noyaux des deux types s'apparient dans l'ascogone mais ne fusionnent pas. Des hyphes se développent à partir de chaque ascogone fertilisé et les paires de noyaux y subissent la mitose. Finalement, les

Copyrighted material

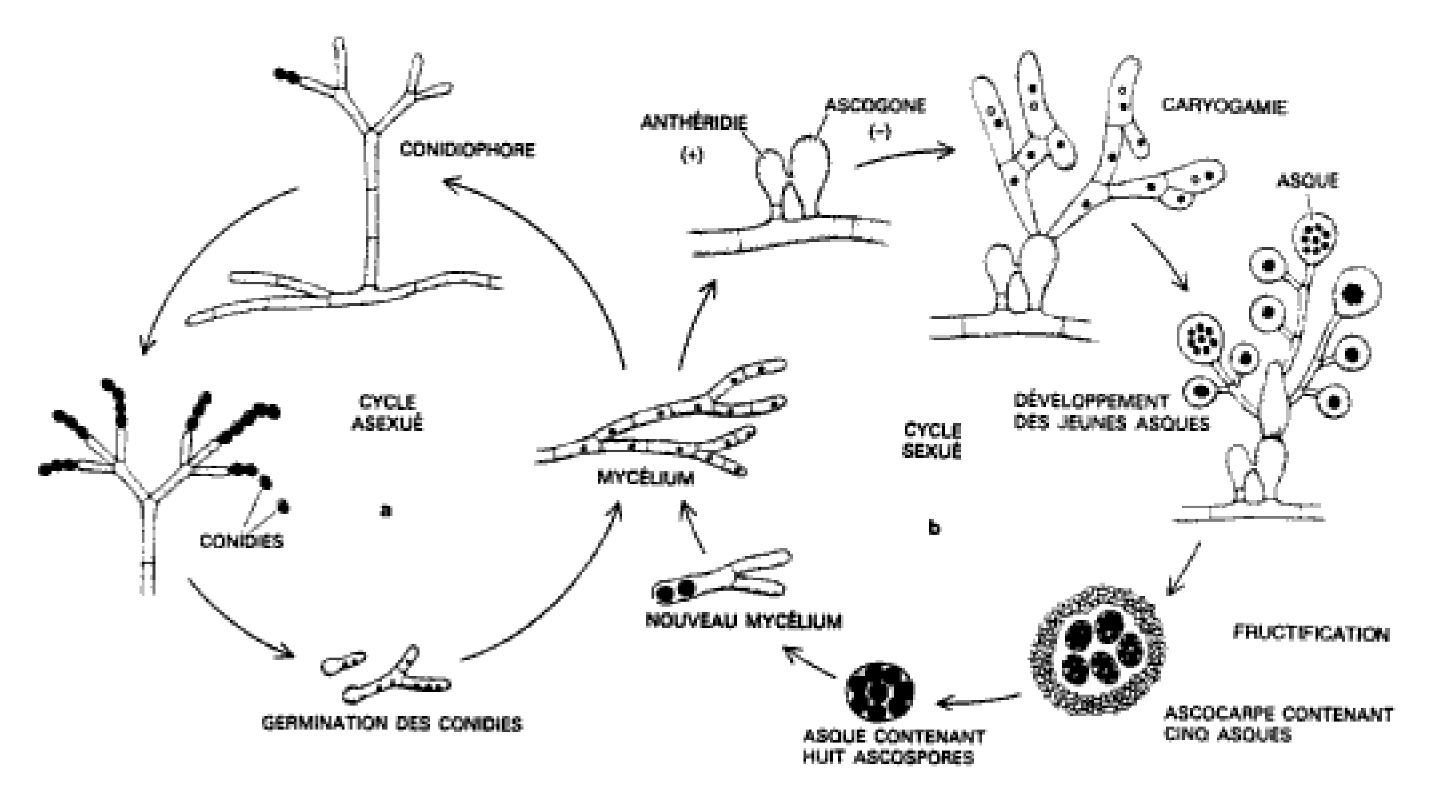


Figure III.10 – **Reproduction d'une moisissure.**
a : cycle asexué ; b : cycle sexué.

noyaux fusionnent à l'extrémité des hyphes (**caryogamie**). C'est la seule étape diploïde du cycle. Ensuite, les noyaux diploïdes subissent une méiose et donnent naissance à 8 noyaux haploïdes, chacun se développant dans une ascospore et donnant ainsi un asque à l'extrémité de l'hyphe. Simultanément, les asques sont « enfermés » par des hyphes et ainsi protégés dans ce que l'on appelle un **ascocarpe** (fructification). Les ascospores germeront ultérieurement pour donner un mycélium binucléé ou multinucléé et le cycle reprend.

La croissance est définie comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les organismes pluricellulaires, elle conduit à une augmentation de taille ou de masse. Chez les micro-organismes unicellulaires (bactéries, levures), elle aboutit à une augmentation du nombre d'individus (division cellulaire). Cet accroissement est donc synonyme de multiplication, puisque toutes les 20 minutes environ, une bactérie peut donner naissance à deux nouvelles bactéries Parallèlement, cette croissance se traduit par un appauvrissement du milieu en substrats catabolisables et par un enrichissement en divers métabolites. Les modifications induites les plus notables concernent le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la conductivité, la pression osmotique, la tension superficielle et la viscosité.

3. Croissance d'une population bactérienne

3.1. Techniques d'étude de la croissance

Sur un milieu solide, ensemencé en surface, une cellule bactérienne donne naissance en 24 heures à une colonie. En étalant une suspension de volume connu et en dénombrant les colonies, on peut déduire le nombre de bactéries présentes initialement. Cette méthode ne permet pourtant pas l'étude cinétique de la croissance. C'est la raison

Copyrighted material

pour laquelle on a recours habituellement aux milieux liquides. Les techniques de mesure de la croissance sont fondées sur l'évolution du nombre de microbes ou de leur masse par unité de volume ou de poids du milieu. Il faut immédiatement remarquer que ces deux grandeurs sont difficilement comparables. En effet, l'augmentation du nombre de microbes est un phénomène discontinu, tandis que l'accroissement de la masse est un processus continu en fonction du temps.

Cette distinction est surtout valable dans le cas de la croissance synchrone, situation exceptionnelle, lorsque toutes les cellules de la population considérée se divisent en même temps. Dans les conditions normales, au contraire, les cycles de croissance pour chacune des cellules de la population se font au hasard et sont totalement asynchrones. Les deux valeurs (nombre et masse) progressant alors de façon parallèle peuvent être considérées comme statistiquement équivalentes.

3.1.1. Mesure du nombre de cellules

3.1.1.1. Lecture au microscope

La méthode est pratiquée couramment pour les microbes de grande taille (plusieurs micromètres) comme les levures. On utilise un hématimètre (cellule de Thoma, de Malassez).

Avec les bactéries de petite taille, on utilise des grossissements très forts, ce qui réduit notablement la profondeur et le diamètre du champ. Pour pallier cet inconvénient, on peut se servir de la cellule de Petrof-Hausser qui diffère de l'hématimètre par une profondeur de la cuvette dix fois plus faible. Cependant, on a recours le plus souvent à la technique de Breed qui consiste à étaler un volume connu (0,01 mL généralement) de la suspension bactérienne sur une aire de 1 cm^2 à la surface d'une lame porte-objet. Après séchage, fixation et coloration, les bactéries sont comptées dans plusieurs champs microscopiques dont on a, au préalable, mesuré le diamètre à l'aide d'un micromètre objectif.

Ceci n'est possible que dans la mesure où l'on a affaire à des cellules bien individualisées, mais se révélera impossible en présence d'agrégats ou d'espèces filamenteuses. De plus, la mobilité de certaines espèces peut représenter un facteur important d'erreurs de dénombrement. Il faudra donc veiller à les fixer préalablement (par exemple dans une solution de formaldéhyde à 2 %).

3.1.1.2. Compteur de particules

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou des cellules en suspension dans une solution d'électrolytes *(fig. III.11)*. Le dispositif de mesure est constitué par un tube cylindrique percé d'un **micro-orifice** de part et d'autre duquel sont disposées deux électrodes reliées à un générateur de courant électrique. Lorsqu'une cellule traverse l'orifice, elle déplace un volume de solution conductrice égal à son propre volume, produisant une augmentation momentanée de la résistance. Au-dessus d'un certain seuil, cette résistance se traduit par une impulsion qui est enregistrée par un compteur électronique. Ce procédé présente l'inconvénient de compter indistinctement cellules et particules inertes de même taille.

La cytométrie de flux permet aussi de dénombrer les cellules après coloration par un fluoro-

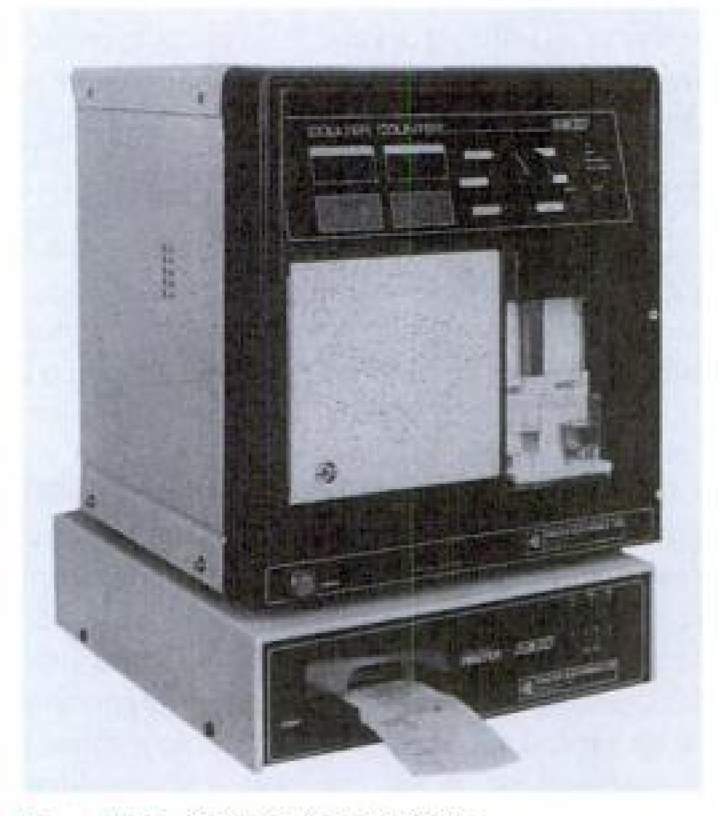


Figure III.11 – **Compteur de particules.**
(Photo publiée avec l'autorisation de Coultronics France S.A.).

Copyrighted material

chrome : les cellules entraînées dans une veine liquide passent devant un détecteur UV qui capte la fluorescence émise par chaque microbe et fournit un histogramme des réponses.

Comme la précédente, ces méthodes ne font pas la distinction entre cellules mortes et cellules viables.

3.1.1.3. *Épifluorescence*

Les bactéries sont colorées par un fluorochrome comme l'orangé d'acridine, puis examinées en lumière ultraviolette. On peut théoriquement compter sélectivement les bactéries vivantes qui sont fluorescentes dans le vert (ADN double brin apparié) et les bactéries mortes dont la fluorescence rouge résulte de la combinaison du fluorochrome avec l'ADN dénaturé. Ce procédé séduisant est cependant d'interprétation délicate. En effet, chez les bactéries vivantes, l'ouverture de la double chaîne nucléotidique lors de la réplication induit aussi une fluorescence rouge. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas d'évaluer les populations inférieures à 10^5 levures par millilitre ou 10^6 bactéries par millilitre. Enfin, nécessitant des cellules bien séparées, ce procédé est inapplicable aux micro-organismes formant des chaînettes ou un mycélium. On peut rendre la méthode plus sélective en utilisant des anticorps marqués par un fluorochrome et en pratiquant l'immunofluorescence.

3.1.1.4. *Dénombrement après culture*

Le dénombrement des microbes viables est une méthode communément utilisée. Plusieurs modalités techniques peuvent être proposées. La plus habituelle est la culture en **boîte de Pétri** *(fig. III.12)*. Un volume fixe de la suspension brute ou des dilutions est étalé à la surface d'un milieu gélosé ou incorporé au milieu avant sa solidification. Après incubation à une température convenable, le nombre de colonies apparues correspond au nombre de cellules microbiennes présentes dans le volume analysé de la suspension. Pour donner à la méthode le maximum de garantie et de précision, la suspension doit être rendue rigoureusement homogène soit par agitation mécanique, soit par un passage bref dans une cuve à ultrasons. La technique doit être parfaitement exécutée et l'analyse faite en triple exemplaire. Le nombre de colonies retenu après lecture des boîtes devra être compris entre 30 et 300. Il faut remarquer que les chaînettes, les amas ou les agglomérats microbiens ne donnent qu'une seule colonie. C'est pourquoi on doit exprimer les résultats non pas en nombre de cellules mais en **unités formant colonies (UFC)**.

On peut aussi estimer le nombre de microbes viables dans une culture par inoculation de quantités fixes de la suspension initiale et de ses dilutions en milieu liquide. Le tube qui donnera une culture après incubation contiendra au moins 1 bactérie viable. En inoculant ainsi 3, 5 ou même 10 tubes par dilution, on augmente la précision des résultats qui sont fournis par des tables statistiques (tables de Mac Crady). Le nombre de cultures positives considérées dans 3 dilutions successives donne le **nombre le plus probable (NPP)** de micro-organismes viables présents dans la culture initiale. La précision obtenue dans ces conditions est nettement inférieure à la précédente.

La méthode par filtration sur membrane est aussi très classique dans le cas d'études spéciales (colimétrie dans les eaux, etc.). Elle consiste à filtrer un volume déterminé d'une suspension sur une membrane filtrante en cellulose qui est ensuite déposée sur un milieu convenable. Elle a l'avantage de concentrer les bactéries présentes en faible quantité dans un milieu. Dans les conditions habituelles (étude de la croissance), elle introduit nécessairement une cause d'erreur par défaut.

Enfin, pour rendre plus rapide l'analyse et dénombrer les cellules viables sans attendre qu'elles forment de véritables colonies visibles, il est possible, selon la technique de Postgate, d'incorporer la suspension bactérienne sur une très mince couche de gélose, coulée sur une lame de verre puis recouverte d'une lamelle transparente. Après quelques heures d'incubation seulement, les cellules viables donneront naissance à des microcolonies faciles à observer en microscopie à contraste de phase. Les cellules mortes resteront isolées. Une autre variante est la technique de la lame immergée, utilisée surtout lors du dénombrement des germes urinaires.

Copyrighted material

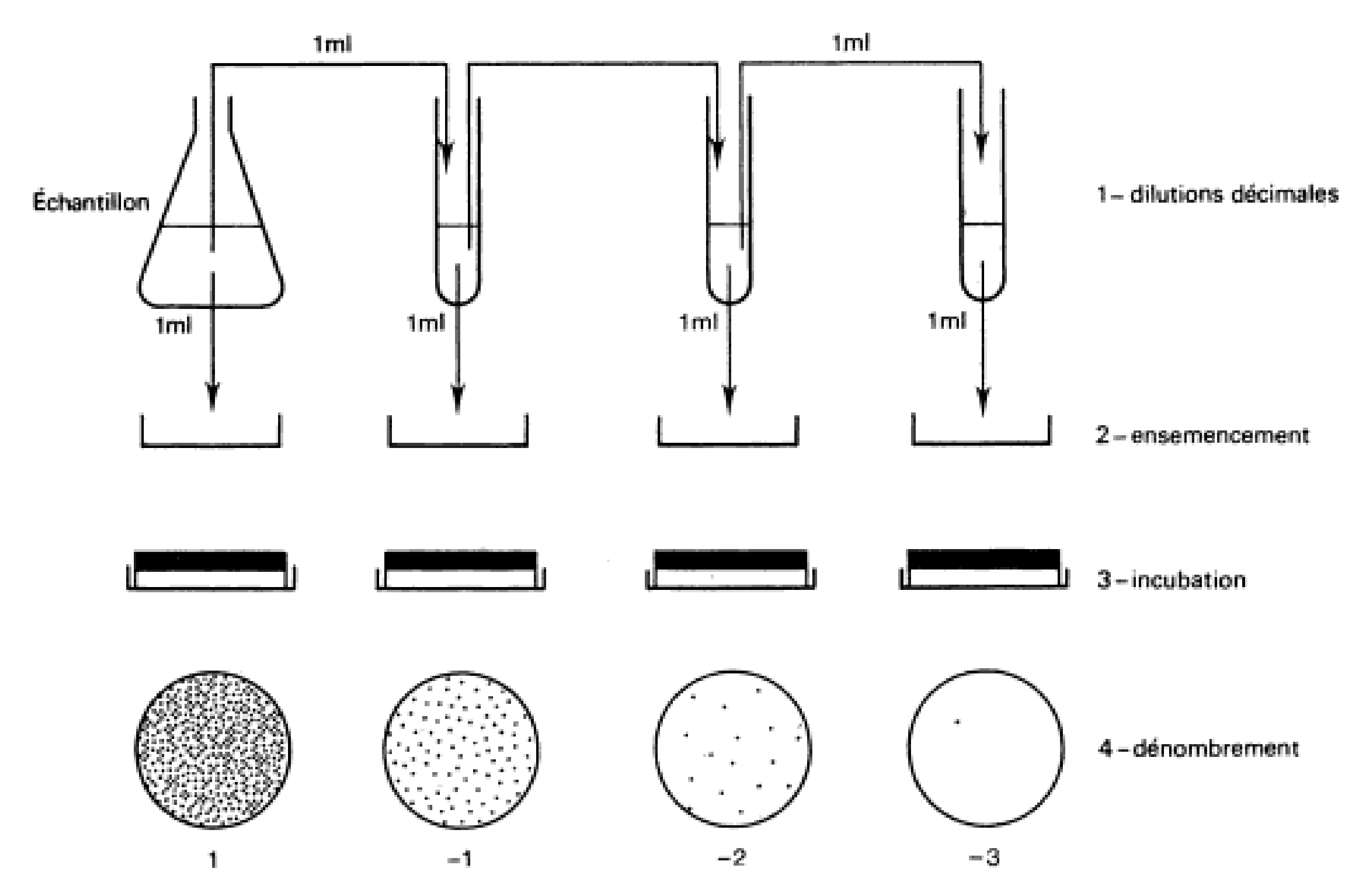


Figure III.12 – **Dénombrement des bactéries par la méthode des dilutions.**

1. L'échantillon est dilué de 10 en 10 ; 2. 1 mL de chacune des dilutions est incorporé en milieu gélosé solide et soigneusement homogénéisé ; 3. Après incubation au temps et à la température convenable on procède au dénombrement, en choisissant de préférence la boîte qui contient entre 30 et 300 colonies.

3.1.2. Mesure de la biomasse

3.1.2.1. Détermination du poids sec

Mesure de base, la détermination du poids sec permet celle de paramètres spécifiques (vitesse de croissance, taux de production de métabolite).

Les micro-organismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane (en général porosité de 1 à 5 µm). Après un lavage soigneux à l'aide d'un tampon approprié (en général solution saline à 0,9 % de NaCl), le culot ou le filtre est desséché à 100-110 °C. Après refroidissement à température ambiante en atmosphère sèche, il est ensuite pesé. Le poids est exprimé généralement en grammes de matière sèche par litre. La mesure du poids sec totalise toute la masse cellulaire, vivante et morte. Malgré la simplicité apparente, la technique est délicate à mettre en œuvre car les opérations de lavage et de dessiccation, notamment, peuvent conduire à des pertes de 5 à 10 % de matière cellulaire ; de plus, un étalonnage est indispensable pour chaque espèce dénombrée.

3.1.2.2. Mesure du trouble

C'est le procédé le plus simple, le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale, appelée **turbidimétrie**, fondée sur la propriété que présente toute suspension de diffracter une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite. Elle mesure le pourcentage de lumière transmise (concentration ou épaisseur du milieu trouble) par rapport à l'intensité du faisceau de lumière incidente (Io). Par définition, log (Io/I) représente l'**absorbance** (A). En négligeant l'intensité de lumière réfléchie et diffusée, on peut écrire :

$$\log (Io/I) = k.C.l$$

où k est le coefficient d'absorption, C la concentration de cellules (ou biomasse) et l le trajet opti-

Copyrighted material

que (épaisseur de la cuve). En travaillant dans une cuve de 1 cm de trajet optique, on peut écrire :

$$\log (Io/I) = k.C.$$

L'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. Il est cependant une limite à cette linéarité aux fortes concentrations. Elle varie avec les micro-organismes et une droite de corrélation avec la matière sèche doit être établie dans chaque cas (en général, cette limite se situe aux environ de 0,8 unité d'absorbance à 650 nm). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible. Il existe des biophotomètres automatiques qui permettent de suivre les cinétiques en continu.

Très séduisante, cette technique est inapplicable avec les milieux de culture très colorés ou troubles. Elle est aussi incapable de différencier les cellules mortes des cellules vivantes et de mesurer des concentrations microbiennes inférieures à $10^6 \cdot mL^{-1}$.

3.1.3. Mesure des constituants cellulaires

Le constituant cellulaire idéal devrait :

– être **ubiquiste** et disparaître rapidement des cellules après leur mort ;

– être absent du milieu ou tout au moins ne pas être associé à des éléments figurés abiotiques qui ne peuvent pas être séparés des cellules ;

– être dans les cellules en concentration à peu près constante quel que soit leur état physiologique.

Le dosage de l'azote cellulaire par Kjeldal ou Bradford représente une méthode facile mais relativement peu sensible. Les méthodes actuelles les plus prometteuses sont fondées sur le dosage par **bioluminescence** de l'**adénosine-5'-triphosphate** (ATP) ou des **nucléotides flaviniques** (FAD, FMN).

• **L'ATP**. Il représente un marqueur biotique de choix. Sa présence est indispensable aux processus de transfert d'énergie dans toutes les cellules. Il n'est pas véritablement stocké car sa concentration résulte d'un équilibre permanent entre les mécanismes couplés de production et d'utilisation. Il disparaît donc à la mort de la cellule. On connaît mal, pourtant, les variations de sa concentration selon les micro-organismes et leur état physiologique.

Bien que l'ATP ait été découvert en 1927, son utilisation comme paramètre d'évaluation de la biomasse résulte d'une observation récente de Mac Elroy. Cet auteur a découvert en effet que la réaction de bioluminescence qui met en œuvre un substrat, la **luciférine**, et une enzyme, la **luciférase**, est dépendante, chez les lucioles *(Photinus pyralis)*, de la présence d'ATP. L'oxygène et un cofacteur, l'ion Mg^{++}, sont aussi nécessaires. Le mécanisme de la réaction *in vitro* peut être décomposé en trois phases :

– **activation** de la luciférine $L\begin{smallmatrix} H_2 \\ CO_2 \end{smallmatrix}$ par fixation de l'adényl de l'ATP avec libération de pyrophosphate,

$$L\begin{smallmatrix} H_2 \\ CO_2 \end{smallmatrix} + ATP \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Luciférase (E)}} \left(AMP - \underset{E}{L}\begin{smallmatrix} H_2 \\ CO_2 \end{smallmatrix} \right) + PP_i$$

– **oxydation** de la luciférine, en présence d'oxygène, avec formation d'un complexe dans lequel la déhydroluciférine ($L^*_{CO_2}$) est électroniquement excitée,

$$\left(AMP - \underset{E}{L}\begin{smallmatrix} H_2 \\ CO_2 \end{smallmatrix} \right) + \frac{1}{2} O_2 \quad (AMP - L^*_{CO_2} - E) + H_2O$$

– **décarboxylation** de la déhydroluciférine. Le retour à l'état électronique fondamental de la décarboxyluciférine s'accompagne d'une émission de lumière,

$$(AMP - L^*_{CO_2} — E) \rightarrow AMP + (L - E) + CO_2 + \text{photons}.$$

La stœchiométrie de la réaction montre que l'oxydation d'une molécule de luciférine met en jeu une molécule d'ATP et libère un photon. Ce rendement quantique optimal est obtenu à pH 7,6 et à 20-22 °C avec des concentrations en ions Mg^{++} de 3 $mmol \cdot L^{-1}$.

Cette technique présente de nombreux avantages. Outre sa spécificité vis-à-vis des microbes viables et sa rapidité (moins de 5 minutes par

Copyrighted material

échantillon), elle est très sensible. Elle permet en effet de détecter environ 10^4 bactéries par millilitre et beaucoup moins si l'on concentre l'échantillon par filtration sur membrane. Elle est applicable à l'**analyse des produits alimentaires.** En microbiologie médicale, elle permet par exemple de mesurer la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques en quelques jours au lieu de plusieurs semaines avec les méthodes classiques (Jakubczak et Leclerc).

• **FAD et FMN.** La flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) sont des coenzymes de déshydrogénase ; elles sont donc universellement rencontrées dans le monde vivant. On peut les doser avec une grande sensibilité par bioluminescence en mettant à profit une propriété de la luciférase extraite de bactéries lumineuses telles que *Photobacterium phosphoreum* ou *V. fischeri.* Cette enzyme catalyse en effet l'oxydation de la flavine mononucléotide réduite ($FMNH_2$) en présence d'un aldéhyde saturé à longue chaîne (R-CHO). La réaction s'accompagne d'une émission lumineuse dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en FMN :

$$FMNH_2 \xrightarrow[O_2 + \text{R-CHO}]{\text{Luciférase bactérienne}} \text{produits + photons}$$

Le rendement quantique de la réaction est optimal à 20-22 °C et à pH 7. La méthode permet de doser 10^{-11} g de FMN. Elle est moins sensible que le dosage de l'ATP (seuil de détection : 10^5 bactéries.mL^{-1}) et exige certaines précautions pour éviter la photolyse des composés flaviniques ; en revanche, elle présente l'avantage de recourir à une luciférase extraite de bactéries dont la culture est plus aisée que la capture des lucioles.

• **Activités enzymatiques**. À ce groupe de méthodes, on peut rattacher la mesure de certaines activités enzymatiques. Les unes, comme les phosphatases qui hydrolysent les esters monophosphoriques en alcool et acide phosphorique, sont très répandues dans le monde microbien. L'activité phosphatasique est dosée à l'aide d'un substrat synthétique, le paranitrophénolphosphate disodique. L'hydrolyse libère le paranitrophénol, composé coloré en jaune, dont on mesure l'intensité par spectrophotométrie. La sensibilité du test est faible. Elle peut être améliorée par addition d'un substrat fluorescent, puis dosage fluorimétrique du produit d'hydrolyse. La **corrélation** avec le nombre de microbes viables n'est cependant pas très étroite.

Il est possible également de suivre la cinétique de production d'une enzyme (spécifique) par les microbes au cours de leur développement. Les mesures ne sont pas toujours convertibles en biomasse lorsque la concentration en enzymes (endocellulaires ou exocellulaires) n'est pas proportionnelle à la multiplication, comme c'est le cas, entre autres, pour la décarboxylase de l'acide glutamique d'*E. coli*, qui n'est synthétisée par les bactéries qu'en fin de croissance.

Enfin, on peut mettre à profit, la propriété que possèdent de nombreux micro-organismes, celle d'accumuler dans leur cellule, par transport actif, certaines molécules du milieu proportionnellement à leur nombre. Sur ce principe, Bourgeois *et al.* (1973) ont proposé, pour le dénombrement de micro-organismes hétérotrophes, la mesure de la concentration d'un acide aminé marqué par un radio-isotope (lysine au 14C). Les microbes de l'échantillon à analyser sont recueillis sur une membrane filtrante puis déposés à la surface d'un tampon imbibé d'un milieu de culture à la lysine marquée. Après incubation, la radioactivité fixée par les microbes sur la membrane est mesurée à l'aide d'un compteur à **scintillation** liquide.

3.1.4. Mesure de l'activité cellulaire

On peut mesurer soit la consommation d'un substrat présent dans le milieu, soit la concentration d'un constituant cellulaire, soit la production d'une molécule excrétée par les cellules, soit encore une variation physico-chimique du milieu.

Il existe en effet une **relation stœchiométrique** entre les éléments nutritifs majeurs nécessaires à la croissance et les produits formés.

3.1.4.1. Mesure de la consommation de substrat

Le substrat peut être une source de carbone, d'azote, d'oxygène ou un facteur spécifique de croissance.

La crédibilité de la méthode dépend de la précision du dosage, de la présence de substances interférentes et de la masse cellulaire formée par unité de substance nutritive consommée. Lorsque ce rapport est faible, comme c'est le cas avec les substances carbonées, azotées et l'oxygène, la corrélation avec la masse cellulaire peut être bonne. Dans le cas contraire (phosphate, sulfate, magnésium), la moindre erreur de dosage conduit a une fausse évaluation de la masse microbienne. Souvent le substrat (sucre) est aussi pour la cellule une source d'énergie. Il peut enfin servir à la synthèse d'un métabolite qui est rejeté dans le milieu et n'est pas incorporé dans la cellule. Pour éviter toutes ces erreurs, chacune de ces molécules doit être dosée séparément.

En raison de ces limites, ces méthodes sont peu utilisées bien que le carbone et l'azote représentent respectivement 50 et 8 à 12 % de la matière sèche des micro-organismes et que des techniques précises et spécifiques de dosage de ces subs-

Copyrighted material

trats soient bien connues (chromatographie liquide haute pression, méthodes enzymatiques, électrodes spécifiques). Au contraire, la consommation de l'oxygène constitue un bon indicateur de l'activité des micro-organismes aérobies. Les mesures peuvent être effectuées par voie **chimique** (oxydation du sulfate de sodium selon la méthode de Cooper), **manométrique** (appareil de Warburg, respiromètre différentiel), **électrochimique** (analyseur à électrode de platine vibrante ou à électrode de Clark), ou **magnétochimique** (analyseur paramagnétique). Lorsque les conditions expérimentales sont parfaitement standardisées, la vitesse de consommation de l'oxygène est corrélative de la vitesse de la croissance.

3.1.4.2. Mesure des produits d'excrétion

Au cours de leur développement, les micro-organismes rejettent dans le milieu extérieur les produits de leur métabolisme. Les métabolites primaires (acides aminés, acides organiques) ne sont pas rejetés en quantité notable car la cellule qui les synthétise en a besoin pour sa croissance. Le rapport entre leur concentration et la biomasse n'est pas nécessairement constant, même dans le cas des mutants hyperproducteurs. Il en est de même des métabolites secondaires comme les antibiotiques. Ces molécules synthétisées par la cellule ne sont pas de bons indicateurs de la biomasse.

Au contraire, certains produits de catabolisme constituent de véritables déchets dont la cellule doit se débarrasser ; leur dosage peut se révéler alors utile. Il en est ainsi du dioxyde de carbone qui résulte de l'oxydation des substrats carbonés (sucres notamment) par les microbes aérobies et anaérobies. On le dose aisément et en continu par spectrophotométrie infrarouge, dans la phase gazeuse du milieu de culture. Le rapport entre le CO_2 et la biomasse varie, notamment selon la voie catabolique suivie par le micro-organisme, la quantité de CO_2 élaborée étant trois fois moindre en anaérobiose qu'en aérobiose. Dans des conditions de culture standardisées, le taux de biomasse peut être calculé à partir d'une droite d'étalonnage préalablement établie. On peut accroître la sensibilité de la mesure en utilisant un substrat carboné marqué au ^{14}C et en dosant le $^{14}CO_2$ qui se dégage par une méthode radiométrique (chambre d'ionisation ou compteur à scintillation liquide).

3.1.4.3. Mesure des variations physico-chimiques du milieu

Les variations physico-chimiques du milieu traduisent une évolution de la croissance. Les modifications de pH, de conductivité électrique, de potentiel d'oxydoréduction et d'énergie calorifique libérée par les cellules peuvent ainsi être mesurées avec intérêt. Avec ces procédés, on cherche moins à évaluer une quantité absolue de biomasse qu'à établir une relation entre sa vitesse d'accroissement et la vitesse de variation du paramètre mesuré.

• **Mesure du pH**. L'acidification des milieux au cours de la croissance est liée à la dégradation des sucres, tandis que l'alcalinisation dérive de celle des sources azotées.

Les **indicateurs** de pH sont couramment utilisés en microbiologie pour mettre en évidence un développement microbien ou pour rechercher une activité enzymatique sur un substrat avec libération d'un métabolite acide ou basique. D'un point de vue quantitatif, c'est surtout l'acidification qui est mise à profit. La **mesure du pH** au cours des fermentations permet d'asservir l'ajout automatique de base pour maintenir une valeur optimale. Sinon, l'activité microbienne serait inhibée par une acidité excessive. Un accroissement important de la densité microbienne se traduit généralement par une faible variation du pH. C'est pourquoi, pour les mesures de biomasse, on préfère titrer l'**acidité totale** qu'on exprime en poids ou en volume d'acide. Cette méthode, peu sensible, est cependant classiquement utilisée, notamment dans l'industrie laitière, pour apprécier la qualité bactériologique du lait, l'acidité de ce dernier étant d'autant plus grande que la concentration bactérienne est élevée. Elle permet aussi de suivre la cinétique de fermentation du lait par des bactéries acidifiantes comme *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus* utilisés dans la fabrication des yogourts. Ici, l'acidité est souvent exprimée en degrés Dornic (°D) qui correspondent au nombre de dixièmes de millilitre de soude M/9 nécessaire pour neutraliser 10 mL de lait *(fig. III.13)*.

• **Mesure du potentiel d'oxydoréduction**. La baisse du potentiel rédox dans les cultures microbiennes résulte de la raréfaction du milieu en oxygène dissous et de son enrichissement en substances réductrices. On peut l'évaluer à l'aide

Copyrighted material

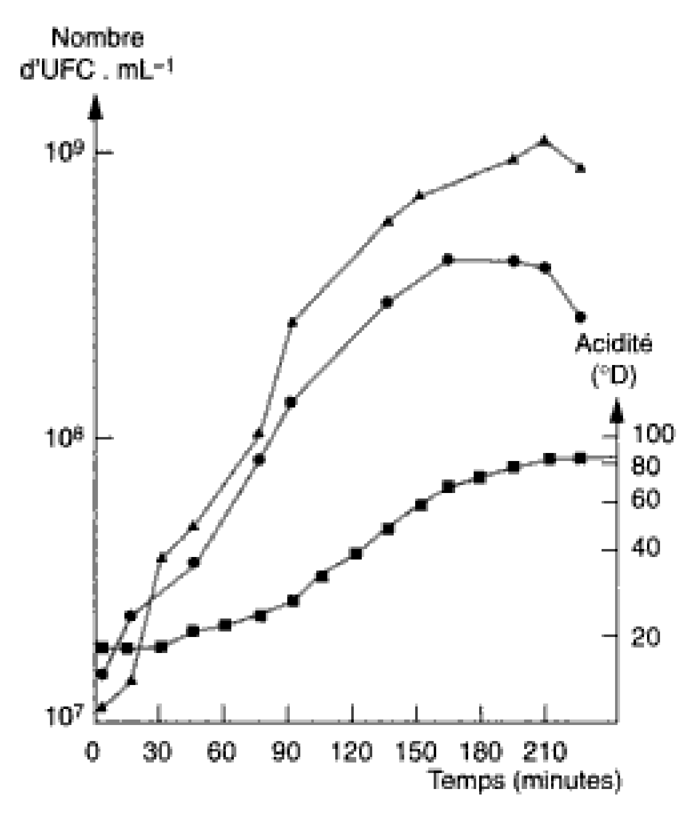


Figure III.13 – **Cinétique d'acidification (■■) et de croissance de Lactobacillus bulgaris (●●) et Streptococcus thermophilus (▲▲) dans du lait.**

(D'après E. Jakobczart).

d'**indicateurs rédox** colorés tels que le bleu de méthylène, la résazurine ou encore le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTZ ou TTC). Le temps nécessaire au virage de l'indicateur est inversement proportionnel au nombre de microbes présents. Ces méthodes sont simples mais peu précises et peu sensibles.

• **Mesure de la production de chaleur.** Toute réaction chimique s'accompagne d'une variation d'enthalpie. Les réactions biologiques n'échappent pas à cette règle générale ; elles se traduisent, au cours de la croissance microbienne, par un dégagement de chaleur lié à la dégradation des substrats énergétiques.

La **microcalorimétrie** permet de déceler ces petites quantités de chaleur libérées par des échantillons de faible volume. L'appareil de mesure est un calorimètre isotherme à conductivité thermique. Il est constitué d'un réservoir calorimétrique de 1 à 4 mL de capacité, où se produit la réaction et dont la paroi représente l'enceinte interne. Cette cellule est placée dans un bloc d'aluminium (enceinte externe) de grande conductibilité thermique. La chaleur dégagée dans la cellule dans le cas d'une réaction exothermique diffuse rapidement vers l'enceinte externe. La différence de température entre les deux enceintes est très faible. On ne mesure par l'augmentation de température, comme c'est le cas avec le calorimètre adiabatique de Berthelot, mais une grandeur proportionnelle au flux thermique qui s'établit entre les deux enceintes. Le système de détection est constitué par un réseau de thermocouples (thermopiles) montés en série qui entoure l'enceinte interne et qui est en contact avec l'enceinte externe. La force électromotrice engendrée par le passage d'un flux de chaleur à travers la thermopile est amplifiée et enregistrée.

Le tracé obtenu est un **thermogramme** dont l'amplitude de chacun des points est proportionnelle à la puissance thermique (dQ/dt) dégagée à l'instant considéré. Elle est exprimée en watts. Le thermogramme traduit globalement les événements énergétiques qui accompagnent la croissance. Son tracé est simple lorsque le substrat énergétique est le seul élément limitant la croissance *(fig. III.14)*. L'accroissement de la puissance thermique est étroitement associé à l'augmentation de la biomasse.

3.2. Croissance en milieu non renouvelé

La croissance des bactéries (dans un ballon de bouillon nutritif par exemple) est limitée. Après une durée de culture, variable selon les espèces, elle s'arrête. Ceci est dû au fait que l'on travaille

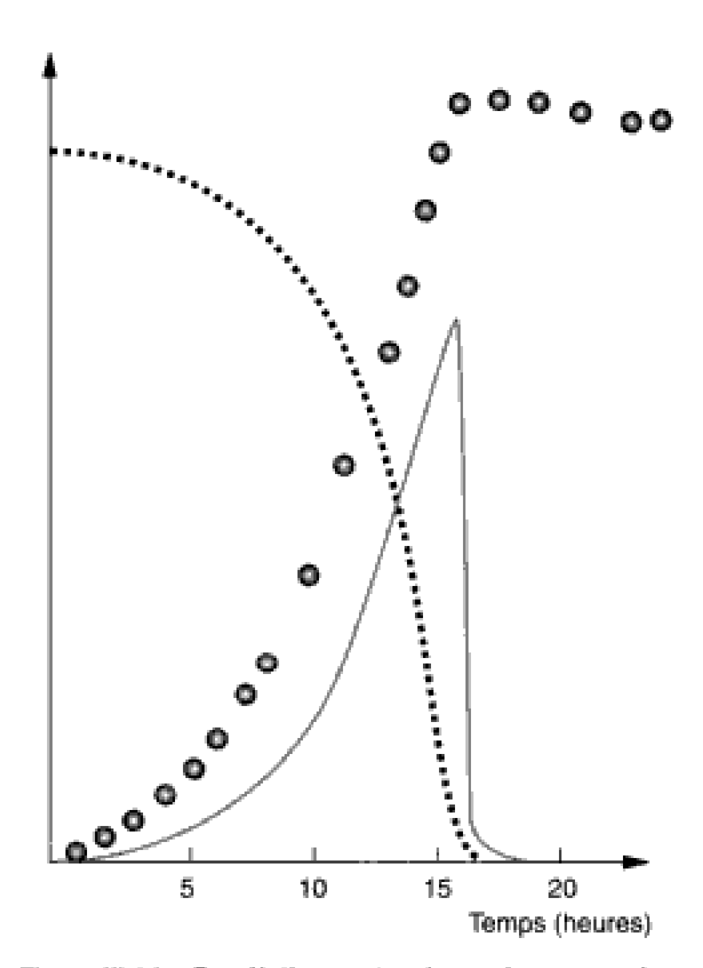


Figure III.14 – **Corrélation entre la croissance microbienne (●●●●●), la thermogénèse (———) et la consommation du glucose (•••••••••), (substrat limitant la croissance).**

Copyrighted material

avec un volume limité de milieu et donc avec des quantités précises et limitées de nutriments. Le milieu finit par s'épuiser. C'est ce que l'on appelle la croissance en milieu non renouvelé par opposition à la croissance en milieu renouvelé, technique cherchant à repousser la limite de croissance, à obtenir une croissance continue que nous étudierons au paragraphe 3.3.

Si la vitesse de croissance restait continuellement constante et maximale, la masse microbienne obtenue en 48 heures seulement serait de l'ordre de 4 000 fois la masse du globe terrestre ! Il est donc heureux que cette croissance, limitée par l'épuisement du substrat ou par l'accumulation de substances toxiques, ne puisse se poursuivre indéfiniment.

3.2.1. Courbe de croissance

Cette courbe est obtenue en traçant l'évolution de la **biomasse** en fonction du temps, $X = f(t)$. On obtient le tracé de la *figure III.15a*.

En tout point de la courbe $X = f(t)$, l'accroissement de biomasse peut donc être exprimé en termes de vitesse. La vitesse volumique de croissance est définie selon la relation :

$$r_X = dX/dt = X \cdot \mu_X$$

et exprimée en biomasse/unité de volume . unité de temps ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). Quand l'espèce bactérienne le permet, on pourra l'exprimer en nombre de cellules/unité de volume·unité de temps.

Dans cette expression de la vitesse, μ_X est un facteur dépendant du germe et des conditions de culture. Ce facteur représente la **vitesse spécifique de croissance**. En effet :

$$\mu_X = 1/X \cdot dX/dt \text{ (unité } h^{-1}\text{)},$$

c'est-à-dire la vitesse volumique de croissance rapportée à l'unité de biomasse.

3.2.2. Phases de la croissance, paramètres d'état

Sur la courbe, différentes phases de la croissance peuvent être définies.

• La phase « a » où X reste identique à X_0 (voire même diminue si l'adaptation au milieu est difficile). C'est la **phase de latence** caractérisée par $dX/dt = 0$ (et donc $\mu_X = 0$).

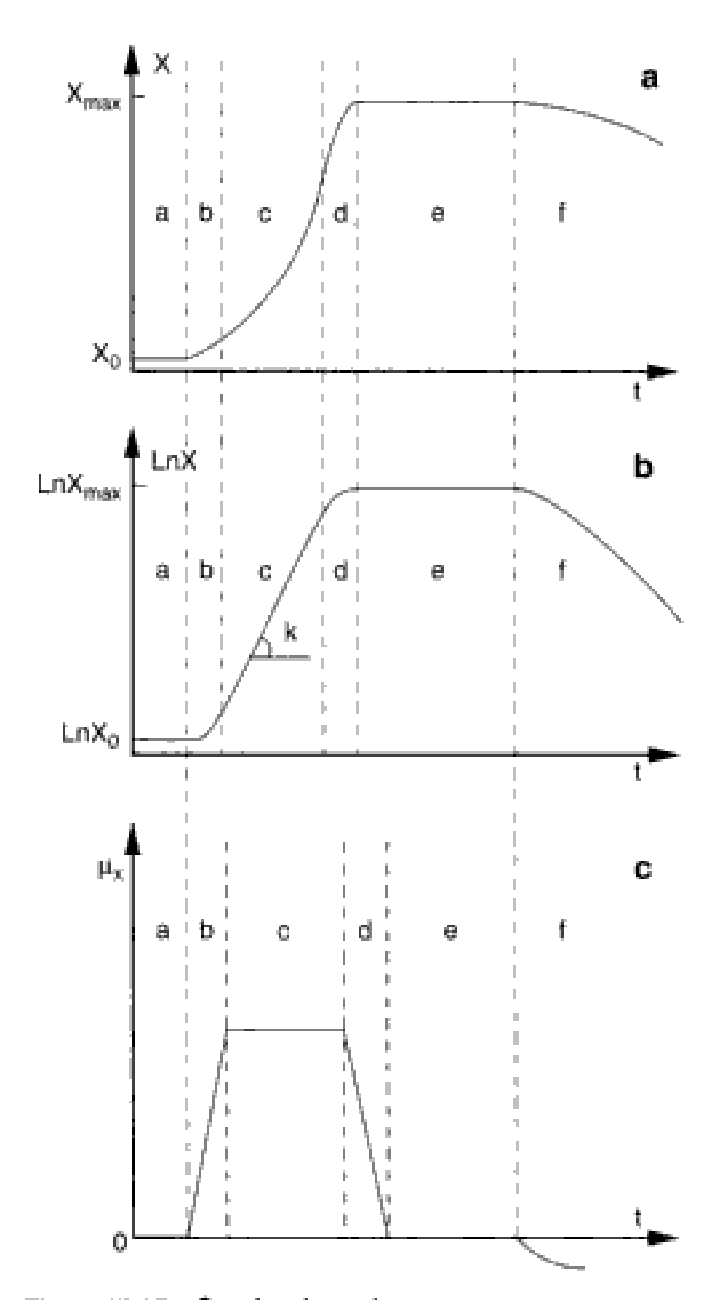


Figure III.15 – **Courbe de croissance.**

a : X = f(t) ; b : LnX = f(t) coordonnées semi-logarithmiques ; c : µx = f(t), µx = vitesse spécifique de croissance ; X = biomasse ; t = temps.

• La phase « b » ou **phase d'accélération** : X augmente de plus en plus rapidement ; dX/dt devient supérieur à 0 et augmente de plus en plus de même que μ_X *(fig. III.15c)*.

• La phase « c » où X augmente de façon exponentielle ; dX/dt augmente proportionnellement à la biomasse et va arriver à un maximum en fin de phase (point d'inflexion). La courbe $LnX = f(t)$ *(voir fig. III.15b)* présente une partie linéaire où LnX est proportionnel à t. C'est la **phase exponentielle** où μ_X est constante et atteint sa valeur maximale dans les conditions expérimentales données.

Copyrighted material

Remarque : on appelait **taux de croissance** le coefficient directeur k de la phase c de la courbe Ln(n) = $f(t)$ et on la note alors $\mu_{x\ expo}$.

Si l'on intègre l'expression de μ_x (voir § 3.2.1.) entre deux valeurs X_1 et X_2 durant cette phase, on obtient :

$$X_2 = X_1 \cdot e[\mu_{x\ expo}(t_2 - t_1)]$$

et donc :

$$LnX_2 = LnX_1 + [\mu_{x\ expo}(t_2 - t_1)](2)$$

soit :

$$\mu_{x\ expo} = (LnX_2 - LnX_1)/(t_2 - t_1).$$

L'expression mathématique de $\mu_{x\ expo}$ permet de déterminer expérimentalement la valeur du taux de croissance (ou taux de croissance népérien).

Pendant cette même phase, on définit le **temps de doublement** de population, noté t_D, qui exprime le temps correspondant à un doublement de la biomasse (ou à un doublement de population).

On peut l'exprimer mathématiquement. D'après la relation (2), on peut écrire, X passant de X à 2X et avec $t_2 - t_1 = t_D$:

$$Ln2X = LnX + \mu_{x\ expo} \cdot t_D$$

et :

$$t_D = (Ln2X - LnX)/\mu_{x\ expo}$$

soit :

$$t_D = Ln2/\mu_{x\ expo}$$

t_D est déterminable graphiquement : sur la courbe LnX = $f(t)$, on prend deux points en phase exponentielle d'ordonnées respectives LnX_1 et $Ln2X_1$ (différence des ordonnées de Ln2 ce qui correspond à un doublement de population). La différence des abscisses correspondantes donnera la valeur de t_D.

Souvent, il est improprement assimilé à **G, temps de génération**, qui exprime, lui, le temps nécessaire à la division cellulaire mais qui ne peut être déterminé expérimentalement, sauf cas exceptionnel où l'on a affaire à une croissance dite synchrone (voir § 3.2.5.). On remarquera que le nombre de divisions (générations) par unités de temps avait été défini au paragraphe 2.1 comme égal à 1/G.

$\mu_{x\ expo}$ et t_D sont les **deux paramètres d'état** permettant de caractériser une croissance dans des conditions expérimentales déterminées.

• La phase « d » dite de **décélération** : l'augmentation de X ralentit, celle de la vitesse *dX/dt* aussi et μ_x diminue.

• La phase « e » où X est à son maximum et constant, *dX/dt* est alors égale à 0. Cela ne veut pas dire qu'il n'y a plus de division cellulaire, en fait le taux de division est alors égal au taux de mortalité (cf. § 3.2.3.3). C'est la **phase stationnaire** avec μ_x égal = 0.

• La phase « f » ou X diminue. La mortalité cellulaire devient plus importante que la division cellulaire. Elle est appelée **phase de déclin**. On pourrait y définir un **taux de mortalité**.

Remarque : dans le domaine industriel, on utilise très souvent un troisième paramètre d'état, le taux horaire de croissance, noté *r*. Il est défini comme étant le rapport des biomasses mesurées à 1 heure d'intervalle. Si au temps *t* la biomasse est X_t et au temps $t + 1$ la biomasse est X_{t+1} :

$$r = X_{t+1}/X_t$$

r n'a pas d'unité.

3.2.3. Physiologie des phases

3.2.3.1. Phase de latence

Comme nous l'avons vu précédemment, c'est la phase pendant laquelle la vitesse spécifique de croissance est nulle, la biomasse n'augmente pas. Elle dure plus ou moins longtemps selon les cas et parfois même n'existe pas, la culture démarrant immédiatement en phase exponentielle.

On a pu constater que, pour une expérience donnée, plus l'*inoculum* est important, plus la phase de latence est réduite (dans les cultures industrielles, par exemple). Cela peut s'expliquer par un simple problème technique de détection de la biomasse, plus facile si l'*inoculum* est déjà important.

L'âge des bactéries semble également avoir une influence : lorsque des cellules jeunes, de quelques heures, sont introduites dans un milieu neuf, la phase de latence peut être extrêmement courte ; elle est au contraire prolongée avec des bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire ou en phase de déclin. Un *inoculum* « âgé » peut contenir une grande quantité de cellules mortes et un faible taux de cellules viables qui devront se diviser de nombreuses fois avant de produire un trouble visible. De plus, les bactéries viables sont aussi dans un état physiologique peu favorable, il leur faut le temps nécessaire pour restaurer tous leurs

Copyrighted material

systèmes enzymatiques mis en sommeil pendant leur maintien à l'état non proliférant.

Autre facteur : la **composition du milieu**. Un *inoculum* cellulaire prélevé en phase exponentielle de croissance et introduit dans un milieu neuf de composition chimique identique se multiplie instantanément sans aucune phase de latence. En revanche, si les constituants nutritifs (source de carbone, source d'azote) sont différents, on observe à nouveau une phase de latence. Celle-ci traduit l'absence d'enzymes nécessaires à l'utilisation de ces nouveaux substrats et la nécessité pour la cellule de les synthétiser. Une période d'**adaptation enzymatique** est nécessaire pour induire la synthèse de ces nouvelles enzymes.

Cette importante activité métabolique peut être montrée expérimentalement.

• **Expérience** *(fig. III.16)* : on examine simultanément la croissance et l'évolution du stock d'ATP (déterminé par marquage au ^{32}P). On constate que le stock maximal se situe juste en fin de phase de latence.

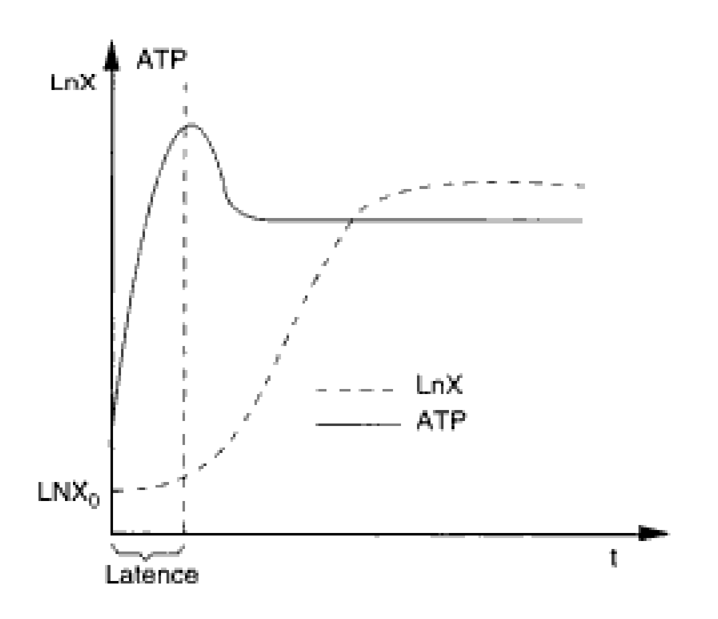
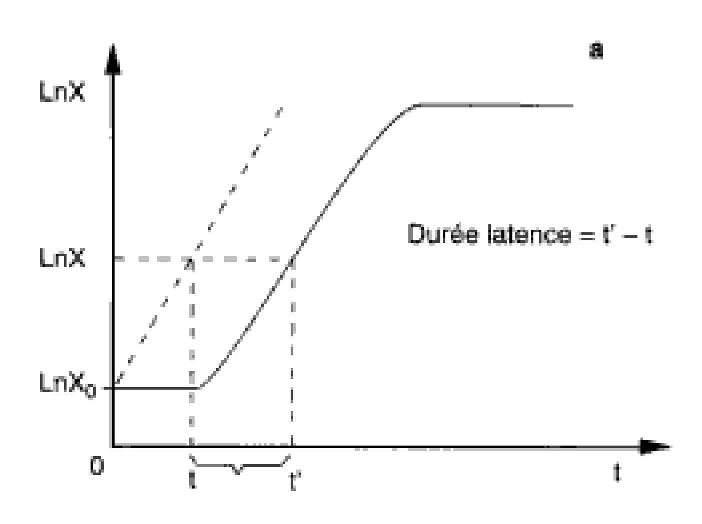


Figure III.16 – **Étude de la phase de latence.**
Évolution du stock d'ATP.



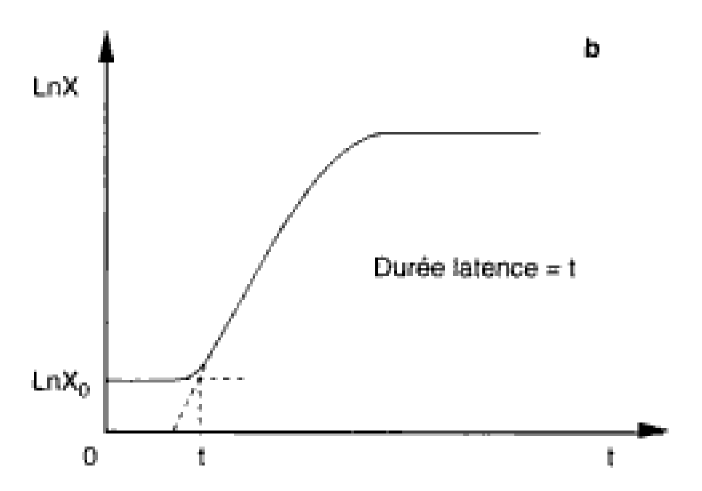


Figure III.17 – **Détermination graphique de la durée de la phase de latence.**
a : première méthode ; b : seconde méthode.

3.2.3.2. *Phase exponentielle, paramètres d'action*

La phase exponentielle fait suite à la période de latence. C'est la phase physiologique par excellence : les bactéries se multiplient sans entrave. Pendant cette phase, on assiste à la libération de métabolites primaires d'intérêt industriel (antibiotiques, toxines, etc.). La vitesse spécifique de croissance est constante et maximale dans les conditions utilisées (taux de croissance). La pente de la droite détermine $\mu_{X\ expo}$, lui-même sous la dépendance des conditions d'environnement comme la température, le pH, la nature et la concentration des aliments. Ces facteurs physico-chimiques constituent les **paramètres d'action** de la croissance.

Les facteurs physico-chimiques qui conditionnent la nutrition sont les mêmes que ceux qui influent sur la croissance. Les plus importants sont la température, le pH et la nature du substrat.

• La **température**. Dans des conditions expérimentales optimales de milieu, de température, de pH, etc., on peut observer trois types de courbes de croissance *(fig. III.18)* correspondant aux trois principales catégories de micro-organismes déjà définies plus haut (voir § 1.4.1.) :

Copyrighted material

– celle des bactéries mésophiles, qui vient d'être décrite ;

– celle des bactéries thermophiles, qui se caractérise par une phase de latence très courte, une multiplication explosive avec un $\mu_{x\ expo}$ très élevé, une phase stationnaire très réduite et une phase de dégénérescence brutale qui conduit à l'autolyse de la culture ;

– celle des bactéries psychrophiles ou psychrotrophes, qui s'oppose point par point à la précédente. La phase de latence est longue, de 2 à 8 jours. La phase exponentielle progresse avec lenteur ; $\mu_{x\ expo}$ est faible. De même, la phase maximale stationnaire peut s'étaler sur de longues périodes. La dégénérescence est lente.

Pour une bactérie donnée, $\mu_{x\ expo}$ varie selon la température de culture *(tab. III.8)*. Ainsi, pour *E. coli*, il est de 0,5 à 18 °C et de 3,3 à 40 °C. Il existe pour chaque espèce une température dite optimale à laquelle $\mu_{x\ expo}$ sera optimal. Si l'on trace la courbe, $\mu_{x\ expo} = f(\theta)$, on obtient un tracé « en cloche » qui définit une zone de température optimale plus ou moins large suivant la bactérie étudiée *(fig. III.19)*.

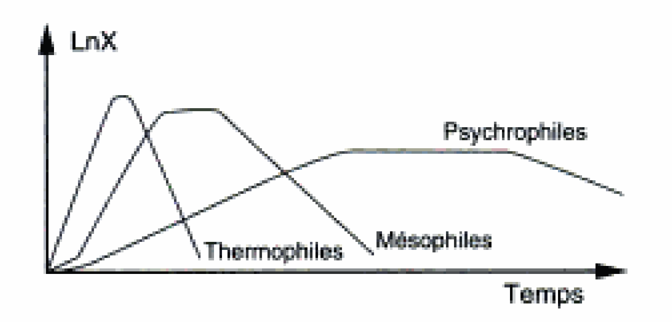


Figure III.18 – Différents types de courbe de croissance.

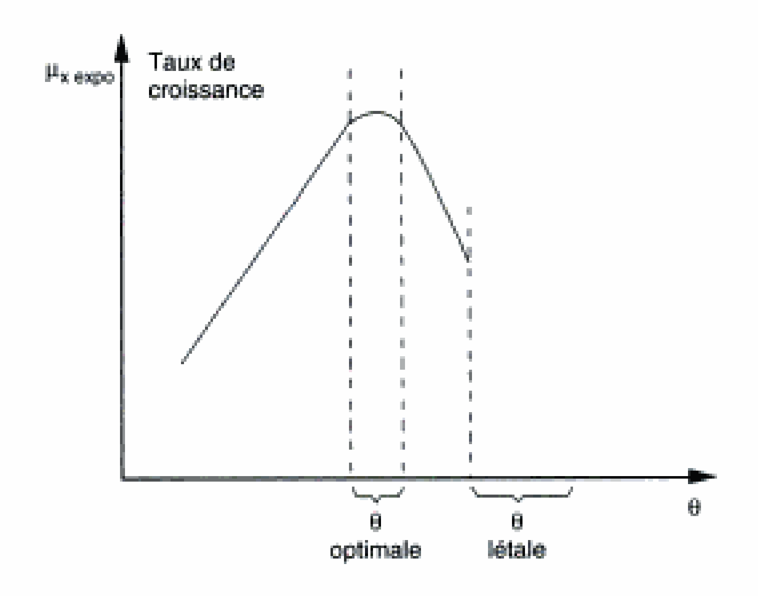


Figure III.19 – Évolution de $\mu_{x\ expo}$ en fonction de la température (θ).

• Le **pH** : l'influence du pH sur la croissance permet aussi de définir un pH optimal de culture comme pour la température *(tab. III.9)*.

• L'**Aw** : comme nous l'avons vu au paragraphe 1.4.5, toute diminution de ce paramètre entraîne un ralentissement de croissance par action sur les réactions biochimiques faisant intervenir de l'eau. $\mu_{x\ expo}$ diminue. On peut déterminer un Aw minimum au-dessous duquel la croissance est ralentie, voire inhibée.

• Le **substrat**. La vitesse spécifique de croissance d'une espèce bactérienne dépend étroitement du milieu dans lequel on la cultive, c'est-à-dire du substrat. Ainsi, avec *B. subtilis*, $\mu_{x\ expo}$ est respectivement de 0,3 et de 2 lorsque le milieu est un soluté synthétique citraté ou un bouillon nutritif.

Tableau III.8 – Vitesse spécifique de croissance et temps de génération en phase exponentielle de bactéries et de la levure.

Micro-organisme	Température (°C)	$\mu_{x\ expo}$ (h^{-1})	Temps de génération (h)
Escherichia coli	40	3,3	0,21
	18	0,5	1,38
Bacillus subtilis	40	1,6	0,43
Clostridium botulinum	37	1,19	0,58
Mycobacterium tuberculosis	37	0,057	12
Rhosporillum rubrum	25	0,15-0,13	4,6-5,3
Saccharomyces cerevisiae	30	0,35	2

Copyrighted material

Tableau III.9 – pH de croissance de quelques micro-organsmes.

Espèces	pH minimal	pH optimal	pH maximal
Bacillus	5-6	6,8-7,5	9,5-11
Clostridium perfringens	5,5	6-7,6	8,5
Escherichia coli	4,3	6-8	9
Lactobacillus	4-4,5	5,5-6	7
Levures	1,5-3,5	4-6,5	8-8,5
Moisissures	1,5-3,5	4,5-6,8	8-11
Thiobacillus	0	3-5	7

L'étude de $\mu_{x\ expo}$ est plus particulièrement utile lorsque l'on considère la concentration d'un facteur limitant dans un milieu synthétique où tous les autres éléments sont fournis en excès. Ainsi, sur la *figure III.20a*, sont représentées les différentes courbes LnX $= f(t)$ pour différentes concentrations croissantes en glucose (de S_1 à S_5). On constate que plus on augmente la concentration en glucose, plus la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle s'élève, pour arriver au niveau de S_5 à un maximum. On peut représenter ces résultats en traçant la courbe $\mu_{x\ expo}$ = f ([glucose]) *(fig. III.20b)*. On voit que $\mu_{x\ expo}$ augmente en fonction de la concentration en glucose qui est ici le facteur limitant, jusqu'à une valeur maximale ($\mu_{x\ expo\ max}$). La courbe obtenue tend vers une asymptote quelle que soit la nature du facteur limitant. Au-delà d'une certaine « valeur seuil » de la concentration, le glucose n'est plus facteur limitant, $\mu_{x\ expo} = \mu_{x\ expo\ max}$.

Mathématiquement, $\mu_{x\ expo}$ s'exprime selon l'équation de Monod :

$\mu_{x\ expo} = (\mu_{x\ expo\ max}\,[S])/(Ks + [S])$

[S] est la concentration en facteur limitant et Ks la constante de saturation, valeur de la concentration en substrat pour laquelle $\mu_{x\ expo} = 1/2\ (\mu_{x\ expo\ max})$. Elle exprime en quelque sorte l'affinité du micro-organisme pour le substrat, une valeur élevée de Ks correspondant à une faible affinité. Par exemple pour *E. coli*, $K_S = 2$ à 4 mg.L^{-1} et, pour *Sc. cerevisae*, $K_S = 25$ mg.L^{-1}.

3.2.3.3. Phase stationnaire

La phase exponentielle ne dure que quelques heures. Le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Le nombre des cellules viables reste constant. Il peut correspondre à un équilibre entre le nombre de cellules provenant de la multiplication et le nombre de cellules qui disparaissent par autolyse. Il peut aussi traduire la per-

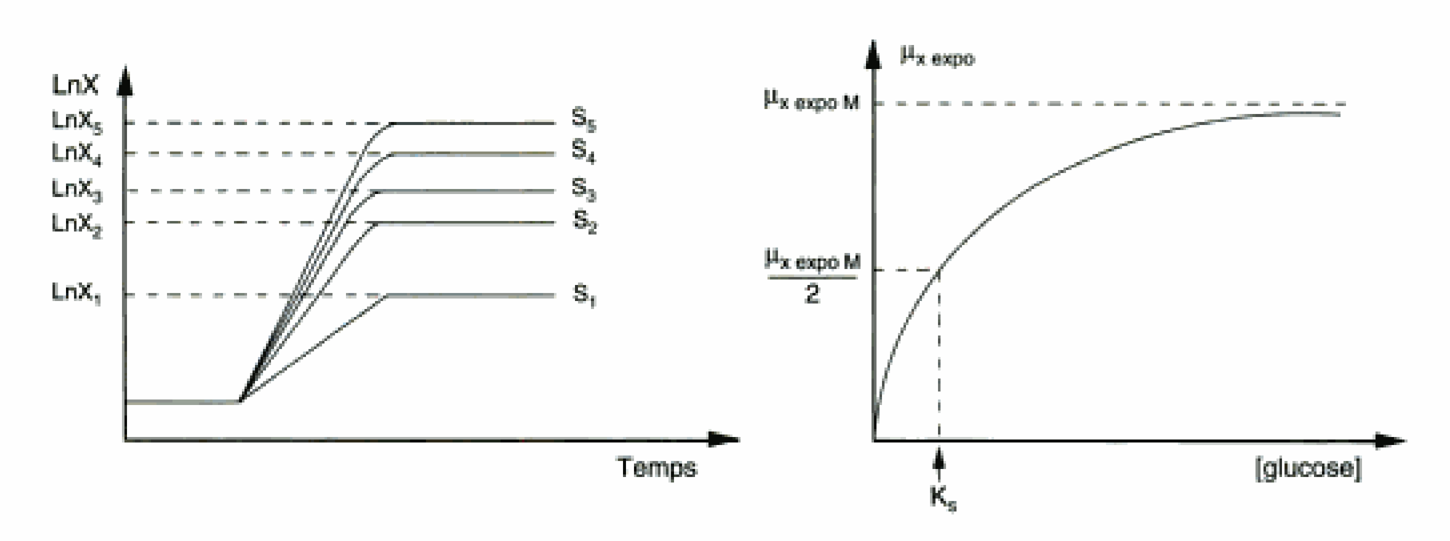


Figure III.20 –
a : courbe LnX = f(t) pour différentes concentrations croissantes en glucose (S_1, S_2, etc.) ; b : courbe $\mu_{x\ expo}$ = f ([glucose]).

Copyrighted material

sistance de bactéries vivantes en l'absence de tout développement. Cette phase est caractérisée par une μ_x nulle. En fait, au niveau des cellules, certaines ne se divisent plus alors que d'autres se divisent encore et ceci en nombre égal : les bactéries se maintiennent à un état « non proliférant ». On peut attribuer ce phénomène à un certain nombre de causes au premier rang desquelles s'inscrirait l'épuisement de l'aliment, l'**accumulation de déchets toxiques** ou l'évolution défavorable de l'environnement physique (pH). Si elles en ont la capacité, les bactéries peuvent également sporuler.

Cette phase peut durer de quelques heures à plusieurs jours. La biomasse finale de bactéries, X_f, dépend du milieu et de ses composants.

Sur la *figure III.20a*, on peut également observer que LnX en phase stationnaire augmente en fonction de la concentration en facteur limitant. Si l'on représente la courbe $X_f = f$ ([substance limitante]) *(fig. III.21)*, on constate que X est d'abord directement proportionnel puis tend vers un plateau où X_f reste constant et maximum ($X_{f\ max}$) ; la substance considérée n'étant plus un facteur limitant : soit il en est apparu un autre, soit la croissance est limitée par l'accumulation de substances toxiques.

3.2.3.4. Phase de déclin

Au cours de cette dernière phase, les bactéries ne se divisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent (autolysines). Le **taux de mortalité** peut être constant comme le taux de croissance. Dans ce cas, il est représenté par une droite, le nombre de cellules détruites étant proportionnel au temps. L'inclinaison de cette droite dépend de l'espèce bactérienne et des conditions générales d'environnement. La phase de décroissance ne se traduit pas toujours par un taux de mortalité d'ordre exponentiel.

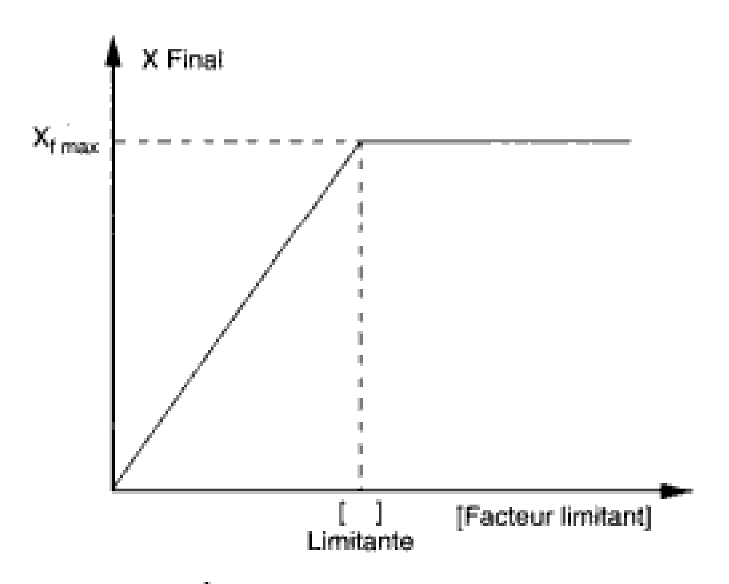


Figure III.21 – **Évolution de la biomasse finale en fonction de la concentration en facteur limitant.**

Dans certains cas, des bactéries survivantes peuvent amorcer une nouvelle phase de multiplication aux dépens des substances libérées par la lyse. Ce phénomène est connu sous le nom de **croissance cryptique** *(fig. III.22)*.

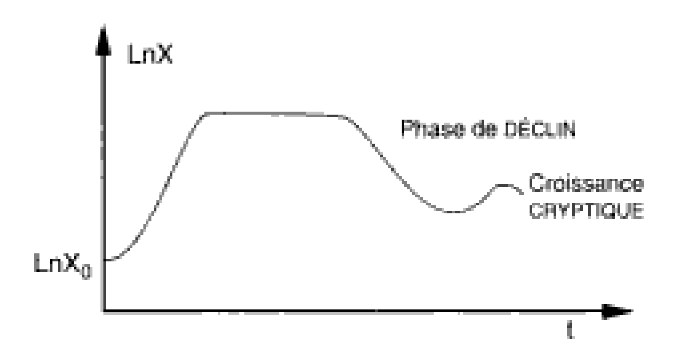


Figure III.22 – **Croissance cryptique.**

3.2.4. Phénomène de diauxie

Dans un milieu synthétique contenant un mélange de deux substrats carbonés, on peut observer une courbe anormale diphasique comme si deux croissances se succédaient. Ce phénomène a été décrit par Monod sous le nom de **diauxie**.

Dans l'exemple de la *figure III.23*, on cultive *E. coli* sur un milieu contenant comme source de carbone un mélange de fructose et d'arabinose. On observe une première phase de croissance exponentielle (A) suivie d'un plateau correspondant à la phase stationnaire puis, après une période de latence intermédiaire (B), une deuxième phase exponentielle de croissance (C). L'analyse montre que, pendant la première période A, seul le fructose est utilisé et épuisé, l'arabinose étant métabolisé seulement dans la deuxième partie (C). On a pu obtenir la même « double » croissance avec un mélange glucose-sorbitol. On peut ainsi classer les sucres en deux groupes :

- G1 : glucose, saccharose, fructose, mannose ;
- G2 : maltose, sorbitol, arabinose, inositol.

Copyrighted material

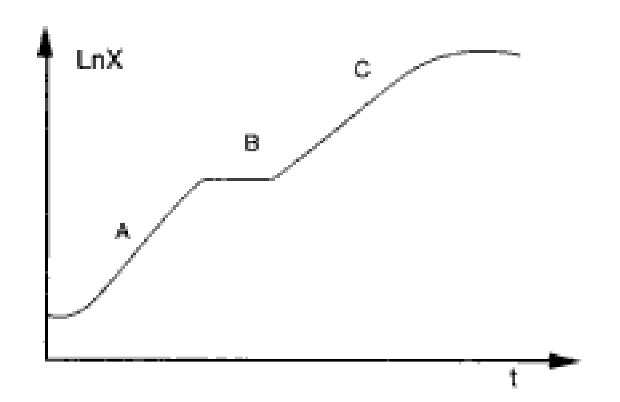


Figure III.23 – **Phénomène de diauxie chez *E. coli* cultivé sur un milieu avec fructose et arabinose comme seule source de carbone.**

A. Utilisation du fructose seul ;
B. Phase d'adaptation à l'arabinose ;
C. Utilisation de l'arabinose.

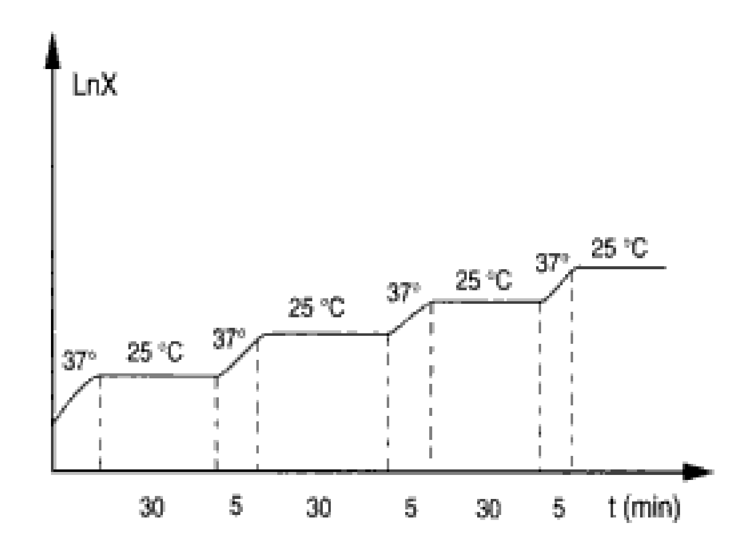


Figure III.24 – **Croissance synchrone obtenue par choc thermique.**

a : par filtration chez le pneumocoque.

Seuls les mélanges G1 + G2 donneront un phénomène de diauxie.

On a décrit des phénomènes de triauxie, notamment avec le mélange glucose-glycérol-sorbitol.

3.2.5. Croissance synchrone

Dans une population bactérienne, les cellules ne se divisent pas toutes au même moment (voir § 2.1.). Le décalage aléatoire correspond à des potentialités différentes de chacune des cellules, qui se traduisent par des latences différentes avant leur croissance que l'on qualifie d'**asynchrone**. Si toutes les cellules se divisaient au même instant, la courbe de croissance montrerait des paliers successifs exprimant les doublements de la population (voir § 2.1., *fig. III.8*). La **synchronisation** de la croissance peut être obtenue expérimentalement à l'aide de procédés physico-chimiques :

– par **filtration sélective** sur un support cellulosique : on récolte les cellules les plus petites les premières apparues ; inoculées sur un milieu neuf, elles ont tendance à se diviser de façon synchrone ;

– par **choc thermique** : les bactéries sont incubées alternativement à des températures contrastées (par exemple + 25 °C et + 37 °C) sur un milieu favorable *(fig. III.24)*.

L'intérêt des cultures synchrones est multiple. Il est possible en particulier d'étudier les différents aspects morphologiques et physiologiques de la cellule au cours des divisions.

3.3. Croissance en milieu renouvelé : croissance continue

La croissance en milieu non renouvelé (ou croissance en discontinu) est donc un système clos où le cycle de développement est le résultat d'une croissance dans un milieu limité en nutriments.

La phase exponentielle de croissance ne peut donc durer que quelques heures. Or, pour de nombreuses expériences de physiologie générale ou, dans un but plus pratique, pour les fermentations industrielles, il est nécessaire de la prolonger. Si le milieu où se multiplient les bactéries est constamment renouvelé tandis que, en même temps, les produits du métabolisme sont éliminés, il doit être possible de maintenir les micro-organismes indéfiniment en phase exponentielle de croissance.

3.3.1. Principe

Dans un tel système où la culture microbienne reste sous un volume constant (V mL), tout en recevant un débit ($Q_v = L.h^{-1}$) de milieu neuf, la concentration cellulaire varie en fonction de la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle ($\mu_{x\ expo}$, taux de croissance) de l'espèce :

$$dX/dt = (\mu_{x\ expo} - D) . X$$

où X = biomasse initiale ; D = vitesse spécifique de dilution (rapport du débit d'entrée sur le volume de milieu, et donc exprimé en h^{-1}) ; t = temps.

On peut donc considérer trois éventualités :

– $\mu_{x\ expo} < D$: l'effet de dilution est supérieur à l'incidence de croissance. Dans ces conditions, la biomasse tend vers 0, car $dX/dt = 0$;

Copyrighted material

– $\mu_{x\ expo} = D$: la vitesse spécifique de dilution est calculée pour que la biomasse reste constante et maximale dans les conditions choisies ($\mu_{x\ expo\ max}$) : $dX/dt = 0$; certains dispositifs ont été conçus pour correspondre à cette situation : ce sont les **turbidostats** ;

– $\mu_{x\ expo} > D$; l'effet de dilution est moins important que celui de la croissance : $dX/dt > 0$. Il va exister donc un facteur limitant et $\mu_{x\ expo} < \mu_{x\ expo\ max}$. La biomasse tend à augmenter ; elle peut être autorégulée pour la maintenir constante. Ceci a été mis au point dans des appareils comme le **bactogène** imaginé par Monod ou le **chémostat** de Novick et Szilard.

3.3.2. Turbidostat

Ce dispositif assure une culture continue à $\mu_{x\ expo\ max}$ et une biomasse constante, X, qui sera choisie en phase exponentielle et restera constante grâce à une régulation de D. Ce principe est illustré par la courbe de la *figure III.25* ; X est maintenu dans un intervalle de + ou – dX dépendant de la précision de la régulation de D. L'appareillage *(fig. III.26)*, très simple, comprend une cellule photoélectrique, réglée sur l'X choisi et reliée à la vanne d'entrée du milieu neuf. Il s'agit d'une **autorégulation** de D en fonction de la biomasse mesurée à la sortie.

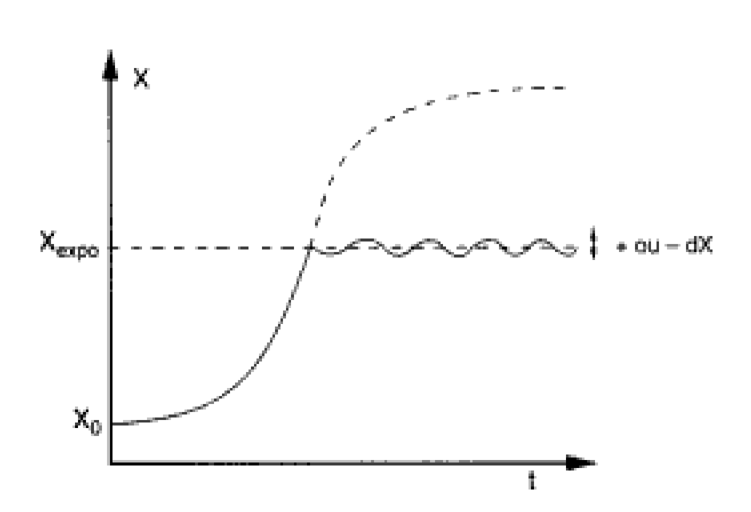


Figure III.25 – **Principe du turbidostat : évolution de X = X_{expo} choisi en phase exponentielle avec $\mu_{x\ expo}$**
------------ croissance en milieu non renouvelé ;
———— croissance continue selon le principe de turbidostat : X varie de + ou – dX.

3.3.3. Chémostat ou bactogène

Dans cet appareil, la vitesse spécifique de croissance n'atteint jamais $\mu_{x\ expomax}$. Sa valeur est liée à la concentration d'un facteur limitant dans la chambre de croissance, tous les autres nutriments étant en excès. Cette concentration dépend du débit de milieu neuf, donc de D *(fig. III.27)* :

– quand D augmente, la concentration en facteur limitant s'accroît et la biomasse, elle, diminue (on dilue le milieu), et donc, $\mu_{x\ expo}$ augmente (loi de Monod) et l'on atteint un nouvel équilibre ;

– quand D diminue, c'est l'inverse et l'on atteint aussi un nouvel équilibre.

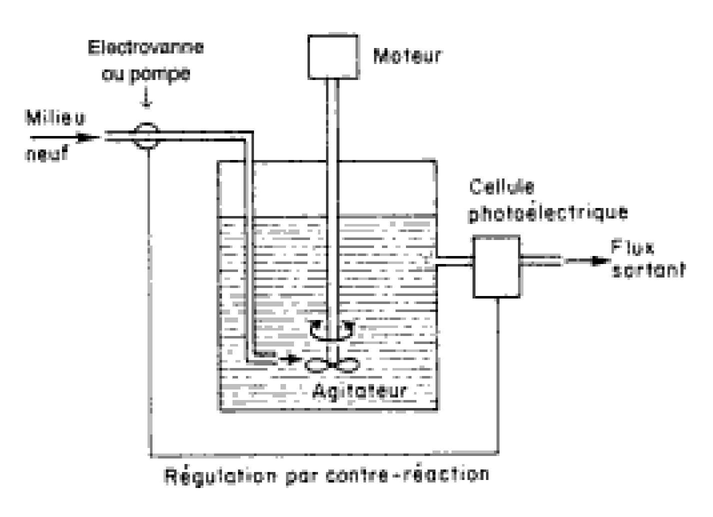


Figure III.26 – **Turbidostat.**

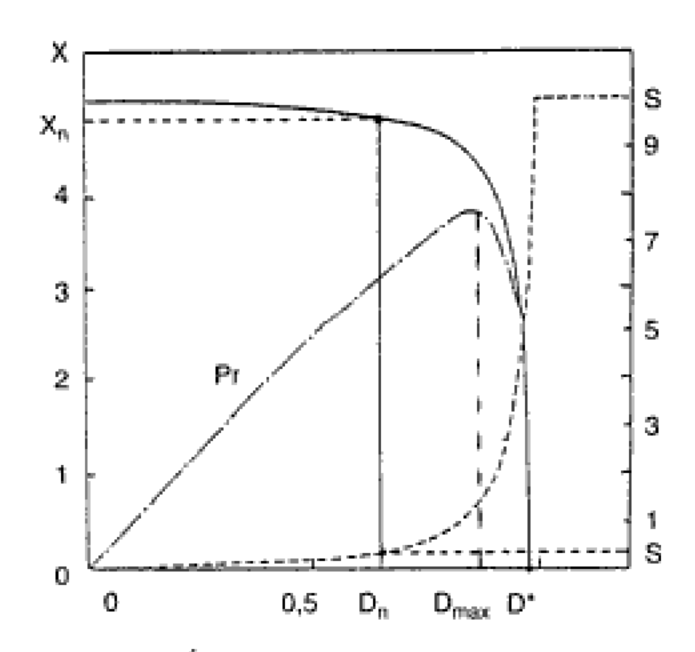


Figure III.27 – **Évolution de la biomasse, de la concentration en substrat et de la productivité en fonction du taux de dilution de milieu.**

Copyrighted material

La diminution de la biomasse quand D augmente, met en évidence une vitesse spécifique de dilution « critique », noté D*, au-delà duquel il devient impossible de travailler car la biomasse tend vers 0. En effet, si D devient supérieur à D*, les cellules sont soutirées plus rapidement qu'elles ne croissent et on tend vers une biomasse nulle : c'est le phénomène de « lessivage » *(wash out)*, néfaste à la poursuite du processus.

En termes de productivité, on peut définir deux phases :

– pour une gamme large de vitesse spécifique de dilution, phase 1 : diminution faible de la biomasse, augmentation légère de la concentration en facteur limitant et augmentation importante de la productivité. Ceci jusqu'à vitesse spécifique de dilution maximum ;

– phase 2 : au-delà de D_{max}, l'augmentation de la dilution provoque une diminution importante de la biomasse et donc un abaissement rapide de la productivité. On tend vers D*.

Il est donc possible de choisir la valeur de la vitesse spécifique de croissance qui convient le mieux en faisant varier D.

Le dispositif lui-même *(fig. III.28)* comprend un récipient de croissance muni d'un siphon de trop-plein et un système assurant l'admission continue de milieu neuf. Après ensemencement, les micro-organismes se multiplient jusqu'à un taux limite correspondant à la concentration limite d'un facteur nutritif introduit dans le milieu. La culture reçoit alors du milieu neuf, à un taux constant : le volume de milieu frais introduit chasse, par le trop-plein, le volume de culture microbienne. On en règle l'apport continu en utilisant des membranes à perméabilité connue et dirigée (sacs de cellophane). Le système est donc **autorégulé**. Les cellules soumises à une aération et à une vigoureuse agitation se multiplient exponentiellement à une vitesse spécifique de croissance rigoureusement contrôlée par l'apport de milieu neuf. L'appareil présente de grands avantages : il permet d'obtenir une culture en croissance exponentielle indéfinie et, surtout, de contrôler la vitesse de croissance, donc la masse microbienne. Ces différentes méthodes sont largement utilisées dans l'industrie dans des appareils à grand rendement, les fermenteurs (voir § 4.4.1.).

3.3.4. Autres systèmes

Depuis ces dernières années, d'autres systèmes plus sophistiqués ont été mis au point, notamment :

– le **système de recyclage** d'une partie des cellules, permettant en inoculant continuellement le chémostat d'opérer à $D > \mu_{x\ expo}$ et d'obtenir une meilleure utilisation du substrat ;

– le **système de chémostats « en série »** *(fig. III.29)* où le premier sert à inoculer le second, permettant ainsi de travailler dans le deuxième chémostat à vitesse spécifique de dilution plus grand que $\mu_{x\ expo}$. Éventuellement, dans ce système, on peut envisager d'utiliser deux milieux de culture différents, le premier pour l'obtention de biomasse, le second, plus spécifique, pour obtenir la production de métabolites ;

– les **systèmes immobilisés** où la rétention en phase insoluble des micro-organismes permet d'augmenter la productivité du système, l'inconvénient majeur résidant dans l'aération efficace de ces systèmes.

3.3.5. Avantages et inconvénients des cultures continues

Le principal avantage des cultures continues réside donc dans le fait que la vitesse de croissance

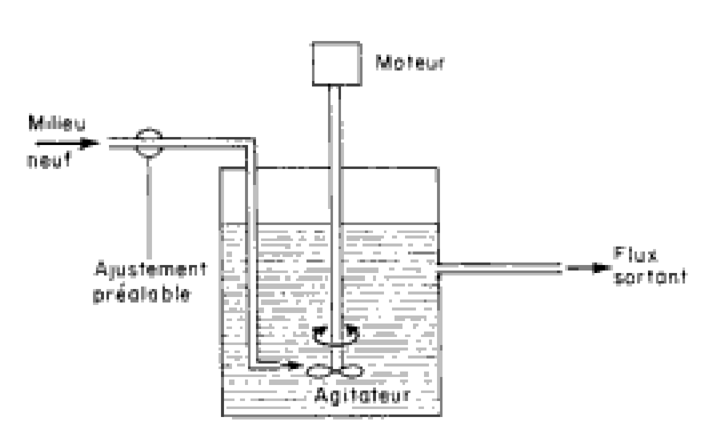


Figure III.28 – **Chémostat.**

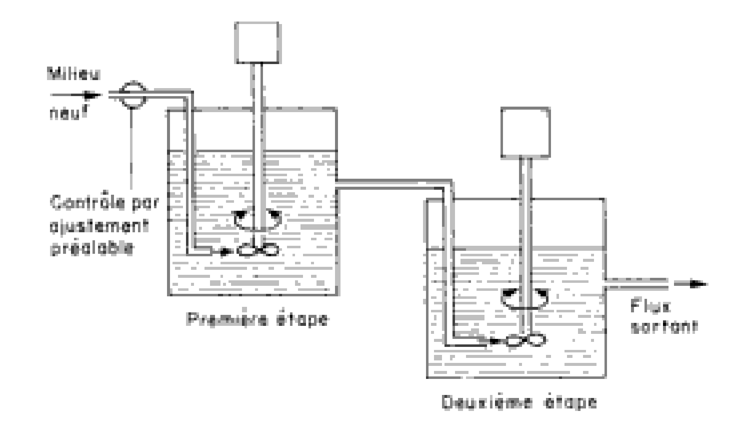


Figure III.29 – **Fermenteur en continu multi-étages.**

Copyrighted material

peut être contrôlée et indéfiniment maintenue ainsi que la biomasse. Ceci va présenter, en aval, de multiples autres avantages :

– études précises des effets dus à des changements du substrat ;

– production de métabolites contrôlée avec productivité déterminée ;

– suivi précis des constantes cinétiques et de l'énergie de maintenance ;

– reproductibilité des résultats ;

– système économique, pas de temps mort ;

– optimisation du système facilement mise en œuvre par injection de nutriments ou modification des paramètres d'action.

Cependant, ce tableau idyllique souffre de quelques inconvénients :

– production de métabolites secondaires pas toujours évidente ;

– agrégation éventuelle des cellules sur les parois, pas de croissance équilibrée, ces cellules sont en quelque sorte « éliminées » du système ;

– sur une longue période, une culture continue peut conduire à la disparition de la souche initiale au profit de nouveaux variants sélectionnés ;

– problèmes particuliers des micro-organismes filamenteux, viscosité et hétérogénéité des cultures ;

– problèmes de contamination inhérents à une longue période de culture.

L'étude des bactéries a connu son plein développement à partir du moment où furent mises au point les méthodes pour les isoler et les cultiver. L'examen microscopique n'est qu'exceptionnellement suffisant pour caractériser un germe et permettre son identification.

Dans la plupart des cas, il est nécessaire d'ensemencer le produit à examiner ou le microbe sur des milieux de culture. Ceux-ci contiennent les substances nutritives indispensables à la croissance. Ils sont disposés dans des récipients en verre de différentes formes (tubes, erlenmeyers, boîtes de Pétri, fermenteurs) stérilisés au préalable.

4. Culture des bactéries et des champignons

4.1. Milieux de culture : généralités

Les caractéristiques des milieux de culture varient, de même que leur composition. On les utilise à des fins diverses : recherche, diagnostic, fermentations industrielles.

4.1.1. Milieux liquides, milieux solides

Les milieux de culture sont liquides ou solides. Les microbes, au cours de leur développement, troublent uniformément les milieux liquides ou encore forment des agglomérats, des dépôts, des voiles superficiels. De tels milieux peuvent servir au diagnostic (réactions aux tests chimiques), à l'étude de la croissance ou à des productions industrielles. Sur un milieu solide, les microbes peuvent former une nappe confluant lorsque les germes ont été déposés en grand nombre à sa surface ; si les cellules bactériennes ont été isolées, leurs descendants s'accumulent en une masse souvent bien délimitée qu'on appelle une colonie et dont l'aspect, les dimensions, les contours et la structure sont autant de caractères précieux qui permettent son identification.

L'état solide est obtenu en présence d'un polyoside **(agar-agar ou gélose)** extrait d'algues diverses, à une concentration de 1,5 %. Cette substance possède la propriété de fixer une grande quantité d'eau (jusqu'à 500 fois son poids) ; soluble dans l'eau à 100 °C, elle se gélifie à 40 °C. Les milieux dits gélosés se liquéfient par chauffage à l'ébullition et se solidifient aux environs de 40 °C. Ils sont transparents et permettent ainsi l'observation des colonies. Quoi qu'il en soit, ces milieux devront assurer un Aw minimum et l'on devra donc veiller, lors de leur confection, de leur stockage et de leur utilisation, à leur donner un degré d'humidité suffisant.

Copyrighted material

4.1.2. Composition des milieux de culture

Précédemment (voir § 1.1.2.), les micro-organismes ont été divisés en deux grandes catégories sur la base de leurs exigences nutritionnelles : les autotrophes et les hétérotrophes. Les premiers ont les besoins les plus simples. Ils possèdent un équipement enzymatique extrêmement élaboré et puissant et peuvent synthétiser tous leurs composants à partir de substances élémentaires. Les seconds, au contraire, exigent pour leur croissance les substances qu'ils ne peuvent synthétiser. Rentrent dans cette catégorie la plupart des bactéries pathogènes pour l'homme, l'animal et les plantes, de même que celles qui font partie de la flore habituelle du corps humain : flore des voies respiratoires, digestive, buccale, vaginale, etc.

Les milieux de culture devront donc fournir les éléments essentiels à la croissance et, souvent, les facteurs de croissance indispensables. Ils seront le plus souvent isotoniques (NaCl à 0,9 %) et leur pH se situera entre 7 et 7,6.

On distingue trois types de milieux.

• **Milieux naturels** ou **« empiriques »**. Ils sont de composition mal définie. L'exemple le plus simple est celui du bouillon nutritif pour bactéries dont la formule est la suivante :

– extrait de viande de bœuf,	5 g ;
– peptone trypsique,	10 g ;
– chlorure de sodium,	5 g ;
– eau distillée,	1 000 mL.

L'extrait de viande est le produit d'une infusion de viande de bœuf, filtrée puis concentrée. Il contient des substances solubles dans l'eau : glucides, composés azotés, vitamines hydrosolubles, sels minéraux, dont on ignore la nature et l'importance. Les peptones résultent de la digestion chimique ou enzymatique de matières protéiques telles que la viande, la caséine, la gélatine. Suivant le degré de dégradation, elles contiennent des polypeptides, des tripeptides, des dipeptides et des acides aminés. On distingue plusieurs variétés de peptones :

– la **peptone pepsique** obtenue par l'action de la pepsine en milieu très acide ;

– la **peptone trypsique** résultant de l'action du suc pancréatique qui contient de la trypsine comme enzyme protéolytique essentiel ;

– la **peptone pancréatique** provenant de l'action de la pancréatine, un mélange de trois familles d'enzymes (lipase, amylase et trypsine) ;

– la **peptone papaïnique** obtenue grâce à la papaïne, une protéinase stricte extraite du latex de *Carica papaya*.

Dans les milieux pour fermentation industrielle, ce sont des sous-produits ou des résidus agroalimentaires qui sont à la base des milieux comme, notamment, les mélasses (issues de la betterave ou de la canne à sucre dans les industries sucrières), la farine de soja, de poisson, de son, l'amidon de maïs, le sirop de maltose…

L'intérêt essentiel de ces produits réside dans leur prix de revient (0,20 €/kg pour la mélasse, 15 €/kg pour les peptones).

• **Milieux « synthétiques »** ou milieux chimiquement définis, par exemple, le milieu urée-indole utilisé lors du diagnostic des entérobactéries. Il permet la recherche de l'uréase et celle de l'indole à partir du tryptophane :

– urée,	20 g ;
– L-tryptophane,	3 g ;
– phosphate dipotassique,	1 g ;
– phosphate monopotassique,	1 g ;
– chlorure de sodium,	5 g ;
– alcool à 95°,	10 mL ;
– rouge de phénol,	25 g ;
– eau distillée qsp,	1 000 mL.

En raison de certaines difficultés de préparation, les milieux synthétiques ne sont utilisés que dans les cas indispensables comme l'étude des besoins nutritionnels d'une bactérie ou encore les dosages de facteurs de croissance.

• **Milieux « semi-synthétiques »**. Dans ce cas, ils contiennent en plus certains composés favorisant la croissance comme l'extrait de levure ou une peptone, par exemple la gelose EMB (milieu de Teague-Levine) :

– peptone,	10 g ;
– phosphate dipotassique,	2 g ;
– lactose,	10 g ;
– éosine,	0,4 g ;
– bleu de méthylène,	0,065 g ;
– agar-agar,	15 g ;
– eau distillée qsp,	1 000 mL.

Copyrighted material

4.2. Recherche et identification des bactéries et des champignons

4.2.1. Types de milieux et utilisation

Les milieux peuvent être aussi classés en fonction de leur utilisation.

• **Milieux « sélectifs »**. Ce sont des milieux qui permettent la croissance du micro-organisme que l'on recherche en inhibant le développement des autres germes. Ils contiennent donc des **agents sélectifs** que l'on appelle encore des **inhibiteurs** tels le cristal violet, le vert brillant, les sels biliaires, les antibiotiques (colimycine, chloramphénicol). Quelquefois, c'est la concentration d'une substance qui donne l'effet inhibiteur : tel est le cas des milieux hypertoniques (NaCl). En voici un exemple, le milieu de Chapman :

- peptone, 10 g ;
- extrait de viande, 1 g ;
- NaCl, 75 g ;
- mannitol, 10 g ;
- rouge de phénol, 0,025 g ;
- agar-agar, 15 g ;
- eau distillée qsp, 1 000 mL.

L'agent inhibiteur est le chlorure de sodium à concentration de 75 % qui permet principalement la culture des *Staphylococcus*.

Le milieu de Drigalski contient le cristal violet comme inhibiteur. Il sélectionne les germes à Gram négatif en inhibant de façon spécifique les bactéries à Gram positif.

Les agents sélectifs de ces milieux agissent sur la **vitesse spécifique maximale** de croissance qui est diminuée pour tous les germes (peu ou moyennement pour ceux qui seront sélectionnés, beaucoup et même totalement pour ceux qui seront inhibés).

• **Milieux « d'enrichissement »**. On parle aussi de milieux d'enrichissement pour désigner certains milieux liquides qui contiennent des agents sélectifs et qui sont destinés à enrichir le milieu en germe recherché. Un exemple en est le milieu de Muller-Kaufmann :

- bouillon de viande, 900 mL ;
- carbonate de Ca, 0,50 g ;
- thiosulfate de Na à 50 %, 100 mL ;
- solution iodo-iodurée, 20 mL ;
- vert brillant, 0,01 g ;
- bile, 50 mL.

Ce milieu est destiné à la recherche des *Salmonella* par coproculture. Il permet l'enrichissement en *Salmonella* et inhibe les autres espèces fécales à Gram positif et à Gram négatif.

Le milieu agit là aussi par ses composés spécifiques sur la **vitesse spécifique maximale** de croissance, celle des germes recherchés sera peu touchée alors que celle des autres germes sera sensiblement réduite, ce qui permet en quelques heures d'augmenter la proportion relative des germes cherchés.

• **Milieux d'« isolement » et d'« identification »**. Les premiers sont des milieux solides de composition simple sur lesquels de nombreux micro-organismes peuvent se développer. Le plus répandu pour l'isolement des bactéries est sans conteste la gélose nutritive que l'on prépare à partir d'un bouillon nutritif et d'un agent de solidification, l'agar ou la gélose. Les bactéries disséminées à la surface d'une gélose nutritive forment autant de colonies qu'il y avait initialement de cellules. Ces colonies, lorsqu'elles sont isolées, permettent de préparer des cultures pures ; elles sont le point de départ d'une étude systématique aboutissant à l'identification. Pour les levures et les moisissures, le milieu « pomme de terre-glucose » et celui de Sabouraud (peptone-glucose) sont les plus répandus. Les milieux sélectifs solides sont également utilisés pour l'isolement des espèces. On a de plus en plus recours à eux parce qu'ils facilitent et accélèrent la recherche. Par exemple, l'isolement particulier des levures ou des moisissures, souvent présentes dans des milieux polymicrobiens, conduit à utiliser des milieux d'isolement du type « pomme de terre » mais à pH acide, ou additionnés d'antibiotique (Sabouraud + gentamycine).

D'autres milieux sont appelés **milieux d'identification** parce qu'ils servent à mettre en évidence une ou plusieurs propriétés chez un micro-organisme précédemment isolée. Ils existent en grand nombre : certains permettent de rechercher l'utilisation ou la fermentation d'un sucre, la production de gaz (hydrogène sulfuré), la formation

Copyrighted mater

d'indole, d'acétylméthylcarbinol (acétoïne) ; d'autres servent à démontrer la présence d'une enzyme (décarboxylase, désaminase, gélatinase, nitratase, hémolysine). Certains milieux d'isolement pourront permettre aussi de contribuer à l'identification par mise en évidence de caractères culturaux particuliers, par exemple le milieu de Sabouraud additionné de triphényltétrazolium utilisé pour la différenciation rapide des *Candida*.

4.2.2. Caractères culturaux

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu solide constitue encore une part importante de l'identification d'un micro-organisme.

• **Bactéries**. Sur milieu solide, après culture en surface (isolement), on peut caractériser les bactéries selon l'aspect des colonies formées. Plusieurs critères peuvent être alors envisagés :

– la taille ;

– la forme : punctiforme, ronde régulière, dentelée irrégulière (striation radiale ou concentrique) ;

– l'aspect : colonies rugueuses, ou R (de l'anglais *rough*), à surface irrégulière ; colonies lisses, ou S (de l'anglais *smooth*), à surface lisse, brillante et régulière ; colonies muqueuses, ou M, à l'aspect gras et coulant. Ces différences sont dues à la composition de la paroi et à l'éventuelle présence d'une capsule (voir chap. II). Il faut préciser cependant que cet aspect n'apparaîtra pas sur tous les milieux d'isolement, la composition ayant une grande influence sur le développement des colonies ;

– l'éventuel envahissement du milieu ;

– le volume : colonies bombées ou plates, étalées ;

– la couleur : selon l'élaboration d'un pigment (voir chap. II).

• **Levures**. On retrouve ici les mêmes critères d'identification que pour les bactéries. Cependant, certains milieux peuvent aider à la mise en évidence de caractères culturaux : colonies de couleur rouge plus ou moins intense des *Candida* sur milieu de Sabouraud additionné de triphényltétrazolium.

• **Moisissures**. Dans ce cas, on travaillera sur milieu solide ensemencé par « touches » et sur milieu pauvre pour éviter le risque de perte des caractères culturaux. Les critères sont examinés à l'œil nu ou sous loupe binoculaire. On notera la vitesse de croissance, la couleur et ses variations en fonction du temps, la couleur de l'envers des cultures, la texture de la surface, les éventuels changements de couleur du milieu.

4.2.3. Culture des bactéries anaérobies

Les bactéries anaérobies ne tolèrent pas la présence d'oxygène. On les cultivera en milieu solide profond ou en milieu réduit ou encore en atmosphère anaérobie.

Les milieux solides profonds sont des colonnes de milieu gélosé de 12 à 15 cm de hauteur dans des tubes fins (180 × 9 mm). On les fait fondre au bain-marie bouillant pour les ensemencer et en même temps pour les régénérer, c'est-à-dire éliminer les gaz dissous, en particulier l'oxygène. Sur ces milieux, les bactéries anaérobies strictes cultivent dans la zone profonde de la gélose jusqu'à 1 cm environ de la surface (voir § 1.4.3.). Elles peuvent ainsi être isolées pour leur étude ultérieure.

Les milieux liquides servent habituellement à l'enrichissement ou à l'identification. Ils contiennent des réducteurs comme le chlorhydrate de cystéine ou des fragments d'organe (cervelle, foie). Ils seront toujours régénérés avant usage. Après ensemencement, on recouvre la surface d'un bouchon de paraffine stérile préalablement fondue pour assurer une meilleure atmosphère anaérobie.

Pour faciliter les opérations d'isolement, de repiquage et d'identification, on peut avoir recours, comme en aérobiose, à des milieux coulés en boîte de Pétri. Pour les mettre à l'abri de l'oxygène, le procédé actuellement le plus répandu est celui de la jarre anaérobie *(fig. III.30)*. C'est un récipient hermétiquement clos où l'anaérobiose est obtenue par dégagement de CO_2 et d'hydrogène provenant de l'hydratation d'un mélange de bicarbonate de sodium, d'acide tartrique et d'hydrure de bore.

4.2.4. Bactéries viables non cultivables (BVNC)

Les germes cultivables représentent de 0,1 à 1 % de la réalité microbiologique d'un prélèvement.

Copyrighted material



Figure III.30 – **Jarre pour culture des bactéries anaérobies (système Gaspak).**

(D'après J.L. Bourdon et N. Marchal, Techniques bactériologiques, Doin, Paris).

Dans les sols, ce n'est en général que 0,3 % et dans les eaux douces que 0,25 % de germes qui sont cultivables. Même dans les boues activées, cette part reste inférieure à 15 %. Actuellement, on connaît 40 grands groupes microbiens dont la plupart ne le sont que par les ARN 16S obtenus après amplification.

Les BVNC n'ont cependant pas perdu leurs facultés de multiplication, voire de pouvoir pathogène lorsqu'elles rencontrent un milieu favorable. Ce sont souvent des bactéries « stressées » par les conditions du milieu où elles se trouvent ou par le transfert sur un milieu de culture auquel elles n'arrivent pas à s'adapter. Par contre, *in vivo*, on observe souvent la reprise de la croissance pour peu que l'environnement leur en laisse le temps.

4.3. Obtention et conservation des cultures pures

Les techniques d'étude et d'utilisation industrielle des micro-organismes exigent toujours l'obtention de souches pures, les produits pathologiques, alimentaires, échantillons du sol ou prélèvements d'air ou d'eau contenant une très grande variété d'espèces.

4.3.1. Obtention des cultures pures

Elle nécessite l'isolement et la caractérisation précise de la souche que l'on veut purifier.

Techniquement, il est possible d'utiliser deux types de méthodes d'isolement : par dilution en milieu liquide et par épuisement en surface d'un milieu solide.

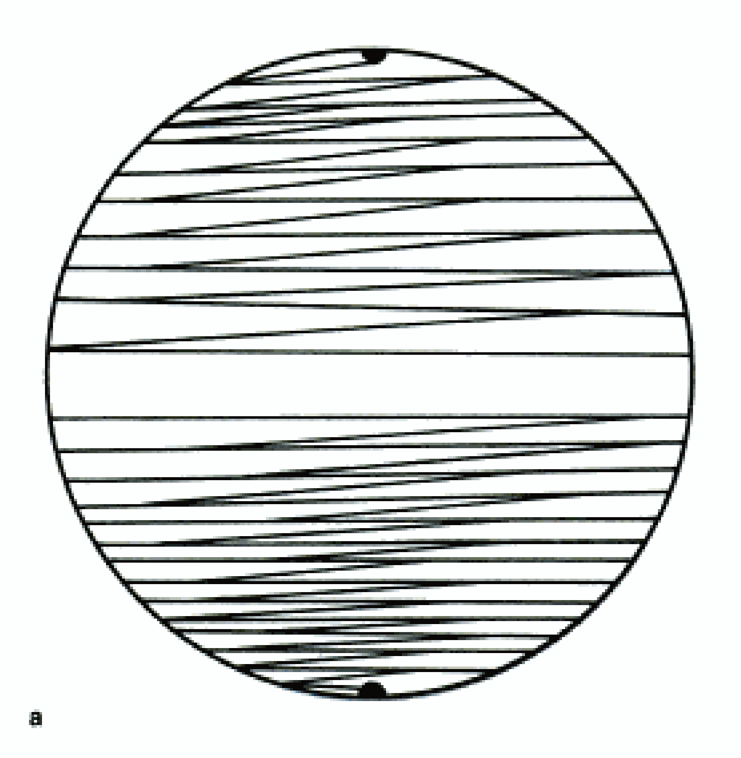
- En **milieu liquide**. Imaginée par Pasteur en 1862, cette technique a connu un grand succès et a été utilisée notamment par le célèbre chirurgien anglais Lister. Le produit d'où l'on veut isoler la souche est dilué dans un milieu stérile (dilutions « en cascade » de 10 en 10). On estime que statistiquement, à un certain moment, on obtiendra des cultures provenant d'une unique cellule. On peut augmenter la probabilité de réussite en ensemençant plusieurs milieux à partir de chaque dilution.

C'est sur ce principe que repose le dénombrement des *E. coli* dans l'eau ou les substances alimentaires. Néanmoins, cette méthode reste très aléatoire, voire inutilisable, dans le cas des champignons filamenteux.

- Sur **milieu solide**. C'est la technique classique d'isolement en surface par la méthode des stries. À l'aide d'un fil métallique bouclé (oëse ou anse), on dépose une petite quantité de milieu à la périphérie de la surface d'un milieu solide coulé en boîte de Pétri. On réalise ensuite des stries parallèles et serrées en continu vers le centre de la boîte, et ceci par moitié *(fig. III.31)*. Après incubation, on obtient des colonies isolées là ou l'on a épuisé le dépôt.

Cette technique reste un passage obligé vers l'obtention de souches pures, surtout pour les bactéries et les levures. Pour les moisissures, elle devra être adaptée, vu leur type particulier de multiplication. De plus, le caractère polymicrobien de

Copyrighted mater


a


b

Figure III.31 – **Isolement.**
a : méthodes des stries ; b : résultat obtenu.

nombreux produits amènera à utiliser des milieux sélectifs.

Isoler ne suffit pas, car on ne se fonde que sur l'aspect morphologique en culture et sur le fait que l'on considère qu'une UFC provient d'une seule cellule et, donc, qu'elle est formée de cellules identiques en tous points. Pourtant, rien n'est moins sûr. On pratiquera donc de nouveaux isolements à partir d'une UFC et, surtout, on caractérisera la souche isolée : caractères morphologiques, culturaux, biochimiques, antigéniques, lysotypiques, ribotypiques, génétiques. On devra impérativement, avec ces différentes techniques, réaliser un « criblage » précis des souches isolées.

4.3.2. Conservation des souches pures

Les laboratoires ont le désir et le souci de conserver les cultures des différentes espèces microbiennes isolées. Ces cultures servent de souches de référence.

Elles sont fréquemment utilisées soit pour l'enseignement, soit pour le contrôle, soit pour la recherche, soit pour la production industrielle. L'intérêt de se référer à des souches standards est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est le maintien en culture pure de micro-organismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus. L'une des plus célèbres est l'American Type Culture Collection (ATCC) située à Rockville, aux États-Unis. En Angleterre, la plus connue est la National Collection of Type Cultures (NCTC) de Londres et, en Allemagne, la Deutsche Sammlung von Micro-organismen und Zellkulturen (DSM), sise à Braunschweig. En France, la plus importante est celle de l'Institut Pasteur de Paris. Lorsqu'une nouvelle espèce est isolée, il est recommandé de l'envoyer dans plusieurs de ces collections internationales pour la faire connaître. Un protocole très précis est alors utilisé pour son incorporation dans la collection *(tab. III.10)*.

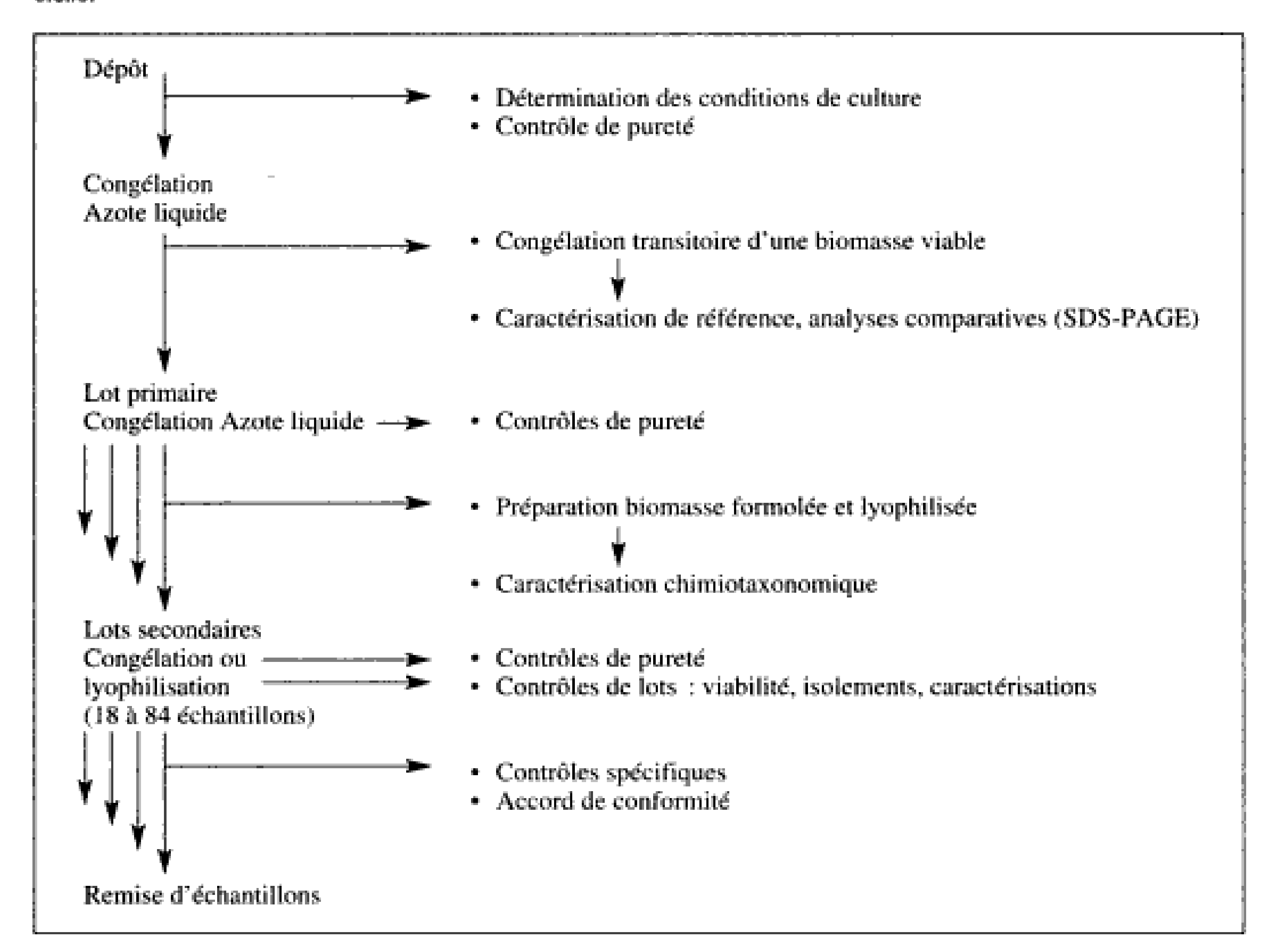
Plusieurs possibilités sont offertes aux collectionneurs pour maintenir les souches en survie et leur conserver toutes leurs propriétés.

• **Conservation à + 4 °C**. C'est un procédé peu efficace, voire dangereux. En effet, de nombreuses caractéristiques des souches disparaissent rapidement, des mutations ont lieu à des taux pouvant dépasser 10 % en quelques semaines seulement.

On peut simplement cultiver les micro-organismes sur des milieux adaptés et les transférer pério-

Copyrighted material

Tableau III.10 – **Schéma général du protocole suivi lors de l'incorporation d'une souche dans une collection officielle.**



diquement sur des milieux neufs (**repiquages successifs**). Il est nécessaire de bien connaître le milieu le plus convenable, la température la plus favorable et la durée limite de stockage. La dessiccation du milieu est évitée en bouchant soigneusement l'orifice des tubes de culture ou, mieux, en les scellant au chalumeau. La culture est conservée à l'abri de la lumière ou à la température du laboratoire ou, dans les meilleures conditions, au réfrigérateur (+ 4 °C).

Le milieu de culture est, dans le cas le plus général, une gélose nutritive inclinée, ensemencée en plusieurs points, ou une gélose nutritive en culot, ensemencée par piqûre centrale.

Ainsi peut-on procéder avec les bactéries à croissance rapide comme le sont les entérobactéries, les *Staphylococcus*, etc. Pour de nombreux autres germes, on aura recours à des milieux particuliers : sérum coagulé pour les *Corynebacterium*, gélose pomme de terre pour les *Brucella*, gélose sans peptone pour les *Bacillus*, etc.

Cette méthode peut être améliorée et utilisant milieux et conditions de culture maintenant les micro-organismes dans un état physiologique et métabolique réduit.

On a pu ainsi conserver de cette manière divers champignons filamenteux durant plus de 25 ans.

Pourtant, par ce procédé, on peut perdre certaines des caractéristiques de la souche. Par exemple, *Stm. griseus* perdra 50 % de sa capacité à produire de la streptomycine au bout de 4 repiquages et pour ainsi dire la totalité de cette propriété au bout de 10 !

• La **dessiccation**, procédé simple à mettre en œuvre, consiste à déshydrater en utilisant la chaleur sèche ou des produits chimiques comme l'anhydride phosphorique. Pour cette opération,

Copyrighted material

les micro-organismes sont disposés sur des supports inertes (Kieselguhr, bandes de papier, cylindres préséchés d'amidon, de dextrane, disques de gélatine, billes de verre, etc.).

- **Lyophilisation**. C'est un procédé de conservation des produits biologiques par dessiccation sous vide à basse température. Ici, les suspensions de micro-organismes sont tout d'abord congelées à basse température puis mises sous vide. L'abaissement de la pression en dessous du point d'équilibre, dit point triple (p = 610 Pa, θ = 0,01 °C) *(fig. III.32)*, entraîne une sublimation de la glace, c'est-à-dire son passage de l'état solide à l'état gazeux sans passer par la phase liquide. La phase de désorption permet d'éliminer l'eau restante (eau liée). Protégées de l'oxygène, de l'humidité et de la lumière, les suspensions peuvent ainsi être conservées pendant très longtemps (en ampoules scellées sous vide). Malgré tout, les micro-organismes subissent, au cours de ce processus, de grandes variations d'environnement qui vont avoir pour conséquences des altérations sensibles autant d'ordre phénotypique que génotypique. Il sera donc nécessaire de les contrôler de façon régulière et rigoureuse.

- **Congélation**. Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent la mise en œuvre de ce procédé : le choix de la température et, surtout, la vitesse d'abaissement à la température choisie

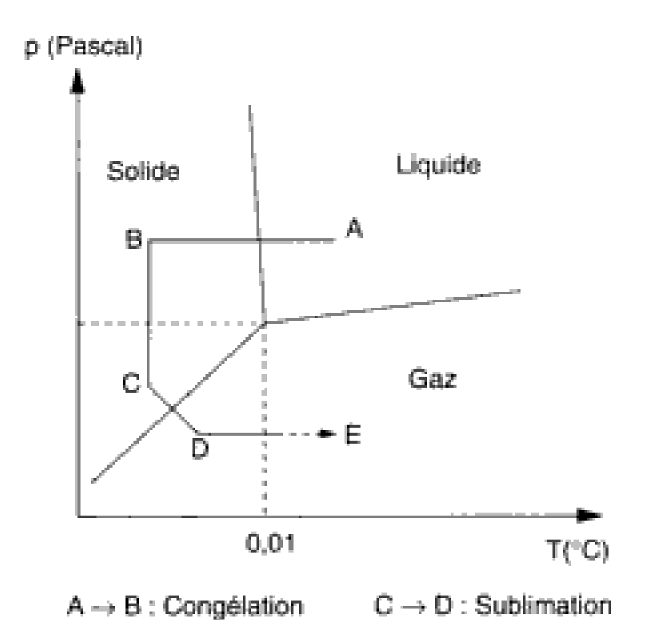


Figure III.32 – **Variation de la tension de vapeur de l'eau en fonction de la température.**

pour conserver dans les meilleures conditions les structures cellulaires. Il convient de congeler à la température la plus basse (souvent – 80 °C) et d'y parvenir dans les délais les plus brefs.

De plus, l'addition d'agents dits **cryoprotecteurs** permettra d'éviter au maximum les altérations cellulaires dues au refroidissement. Mais ces agents seront d'autant plus efficaces que la vitesse de congélation sera faible.

En général, on travaille avec une vitesse de 1 °C.min^{-1} jusqu'à – 30 ou – 40 °C avec, comme agent protecteur, du glycérol à 10 % ou du DMSO (diméthylsulfoxyde). Ensuite, les souches congelées seront conservées sous azote liquide à – 196 °C ou sous vapeur d'azote à – 120 °C. Pour leur remise en culture, il sera préférable d'assurer une décongélation la plus rapide possible.

Le *tableau III.11* indique la méthode de conservation des souches.

4.4. Fermentations industrielles

La croissance continue, séduisante dans son principe, a reçu des applications industrielles que l'on qualifie de **fermentations** (quelquefois à tort).

Dans la fermentation discontinue par exemple, on cultive les micro-organismes dans une cuve (ou fermenteur), souvent de grand volume, pour les récolter ou extraire les produits formés après une période de temps déterminée. Ces fermenteurs appartiennent au groupe de ce que l'on appelle les bioréacteurs, enceintes permettant la culture de tous types de cellules (animales, végétales, micro-organismes) et qui doivent répondre à des critères stricts de conception permettant d'influer efficacement sur la culture (volume supérieur au litre, enceinte stérile, aération et agitation modulables) ainsi que de contrôler et de piloter les paramètres physiques et chimiques de la culture (température, aération, agitation, pH, substrats, produits, etc.).

4.4.1. Bioréacteurs

4.4.1.1. Généralités

Enceintes hermétiquement closes, les bioréacteurs doivent permettent une stérilisation facile et le maintien de l'asepsie pendant toute la durée de

Copyrighted material

Tableau III.11 – **Méthodes de conservations de souches bactériennes généralement utilisées.**

Important :
- Milieu pas trop riche
- Contenant bien bouché
- Stockage à température constante
- Stockage à l'abri de la lumière

Durée courte :
- Pour expédition → milieu de transport (VF ou spécial) → 3 jours θ ambiante
- Au laboratoire → milieux spéciaux adaptés au germe :
  ex. : *Haemophilus*, gélose gélatine → 1 à 2 semaines à 37 °C
  ex. : Anaérobies sporulées, VF → 1 à 2 mois à 4 °C

Durée moyenne :
- Milieux spéciaux
  ex. : *Brucella*, gélose pomme de terre → 3 mois à 22 °C
  ex. : Corynébactéries, sérum coagulé → 8 à 12 mois à 22 °C
  ex. : *Pseudomonas*, macération gélatine de Legroux → 12 à 24 mois à 4 °C
- Congélation – 20 °C à – 70 °C → suspension 10 % glycérol → plusieurs mois
- Milieux de conservation → piqûre centrale en gélose
  ex. : Staphylocoque → 4 à 6 mois à 22 °C
  ex. : *V. cholerae* → 3 mois à 22 °C

Longue durée :
- Milieux de conservation → piqûre centrale en gélose
  ex. : Entérobactéries → 10 ans à 22 °C
- Spores → gélose sans peptone ou terre
  ex. : Bacillus → illimitée
- Lyophilisation → variable selon espèces de 4 ans (halophiles) à 10 ou 20 ans (Gram – et Gram +)
- Congélation azote liquide – 196 °C → milieu liquide 10 % DMSO-Glycérol → illimitée (si congélation lente, décongélation rapide)

la culture. Ils doivent également résister aux vibrations (lors de l'agitation), aux surpressions et à la corrosion. En général, le volume utile ne représente que les 4/5 du volume total de la cuve. Pour les petits volumes (< 10 L) la cuve est en général fabriquée en verre. Pour les volumes supérieurs, ce sont des enceintes en métal inoxydable avec des hublots permettant un contrôle visuel de la culture *(fig. III.33)*.

Pour les petits bioréacteurs, la stérilisation de l'ensemble (cuve + milieu) pourra être assurée par autoclavage sous pression à 120-125 °C. Les bioréacteurs plus importants pourront être constitués d'une double enveloppe permettant une circulation de vapeur autour du corps de l'appareil ou être pourvus d'une simple résistance métallique plongeant dans le milieu (dans ce cas, on procédera à une tyndallisation en évitant ainsi la détérioration du milieu) ou encore on procédera à une injection directe de vapeur sous pression par le système d'aération.

Toutes les entrées (substrats, antimousse, *inoculum*, aération, bases ou acides, etc.) devront être stérilisables et ne pas comporter d'espaces morts. Il en sera de même des sorties (prélèvement).

Il existe ainsi plusieurs types de bioréacteurs selon que l'on travaille en milieu liquide, en milieu solide ou avec des systèmes immobilisés.

4.4.1.2. Systèmes en phase liquide

Trois procédés peuvent être utilisés :

– **culture en discontinu** (*batch* en anglais) à volume constant sans renouvellement de milieu. En fin de culture, tout est traité et le bioréacteur doit être nettoyé et stérilisé pour une prochaine culture *(fig. III.34)* ;

– **culture en discontinu alimentée** (*fed-batch* en anglais) avec addition contrôlée de certains composants en cours de fermentation ;

– **culture continue** – turbidostat et chémostat (voir § 2.4.). On pourra, dans le cas de production

Copyrighted material



Figure III.33 – **Fermenteurs industriels.**
(Document INFORS-FRANCE).

de métabolites secondaires, utiliser des systèmes « multi-étages » mettant en batterie plusieurs fermenteurs en continu *(fig. III.29)*.

À l'heure actuelle, ce sont les systèmes en discontinu qui présentent à la fois le plus de flexibilité, de simplicité de conception et de sécurité, mais ceci au détriment du coût pour lequel les systèmes en continu, surtout le chémostat, sont le plus rentables.

Dans ces systèmes, l'agitation est un facteur essentiel de la réussite de la culture. Le choix de la vitesse et du type des pales est important. Pour les micro-organismes, dont les cellules sont relativement résistantes, on utilise des agitateurs de type radial *(fig. III.35)* et une vitesse importante. Cette agitation est également primordiale pour l'efficacité d'aération mais, dans certains cas, elle peut présenter un gros inconvénient créant des forces de cisaillement trop importantes. Les systèmes mécaniques peuvent être alors remplacés par l'agitation par air *(air-lift)* : système d'injection d'air par le bas *(tower)* utilisé par exemple dans la production d'acide citrique par *A. niger* *(fig. III.36)*, système d'injection par le haut *(deep shaft reactors)* dans le cas du traitement des eaux usées… Ces systèmes, très répandus pour les cultures de cellules animales et végétales, présentent en plus des avantages nombreux : augmentation de la dissolution de l'oxygène, risque de contamination diminué (pas d'arbre d'agitation), travail en très grand volume. Le gros inconvénient de ces systèmes est leur coût élevé.

4.4.1.3. Systèmes en phase solide

Dans ces systèmes, les substrats sont simplement humidifiés et non solubilisés ou en suspension. Traditionnellement, ils sont utilisés depuis fort longtemps en Asie (fabrication du vin de riz). Les substrats le plus utilisés sont les grains de céréales, les copeaux de bois, la paille…

Les micro-organismes doivent avoir la particularité de présenter une tolérance à un Aw faible ; c'est le cas des champignons filamenteux et des levures.

Plusieurs types de systèmes sont utilisés : colonnes à lit fixe, plateaux, fermenteurs rotatifs… *(fig. III.37)*.

Leurs principaux avantages résident dans leur simplicité, la forte productivité obtenue et le peu d'énergie exigée. Par contre, le contrôle s'avère aléatoire, la contamination facilement possible et il est très difficile de travailler avec de très grands volumes.

4.4.1.4. Systèmes immobilisés

La mise au point de ces systèmes présente, au niveau théorique, plusieurs avantages :

– conservation du matériel biologique en fin de culture ainsi réutilisable pour d'autres cycles ;

– opérations de récupération des produits facilitées, la souche n'étant pas dispersée dans le milieu réactionnel ;

– accroissement de la densité cellulaire et des vitesses de réaction.

En principe, tous les types de cellules peuvent être immobilisés par des processus divers, dérivés des techniques utilisées pour les immobilisations d'enzymes. Quatre types d'immobilisations peuvent être utilisés :

– l'**adsorption**, qui est un processus fort ancien utilisé lors de la fabrication du vinaigre, dans lequel les *Acetobacter* sont adsorbés sur des copeaux de hêtre. Maintenant, on utilise des billes de PVC (*Sc. carsbergensis* : fabrication de bière), de DEAE cellulose (*Nocardia erythropolis* : conversion de stéroïdes), des rafles de maïs… ;

– l'**inclusion**, avec incorporation des micro-organismes dans une matrice d'un polymère rigide tel qu'alginate de sodium (*Sc. cereviseae* : production d'alcool, *Methanosarcina barkeri* : production de méthane), polyacrylamide (*Arthrobacter simplex* : production d'hydrocortisone, *B. subtilis* : production d'α-amylase, *A. niger* : production d'acide citrique) ;

Copyrighted material

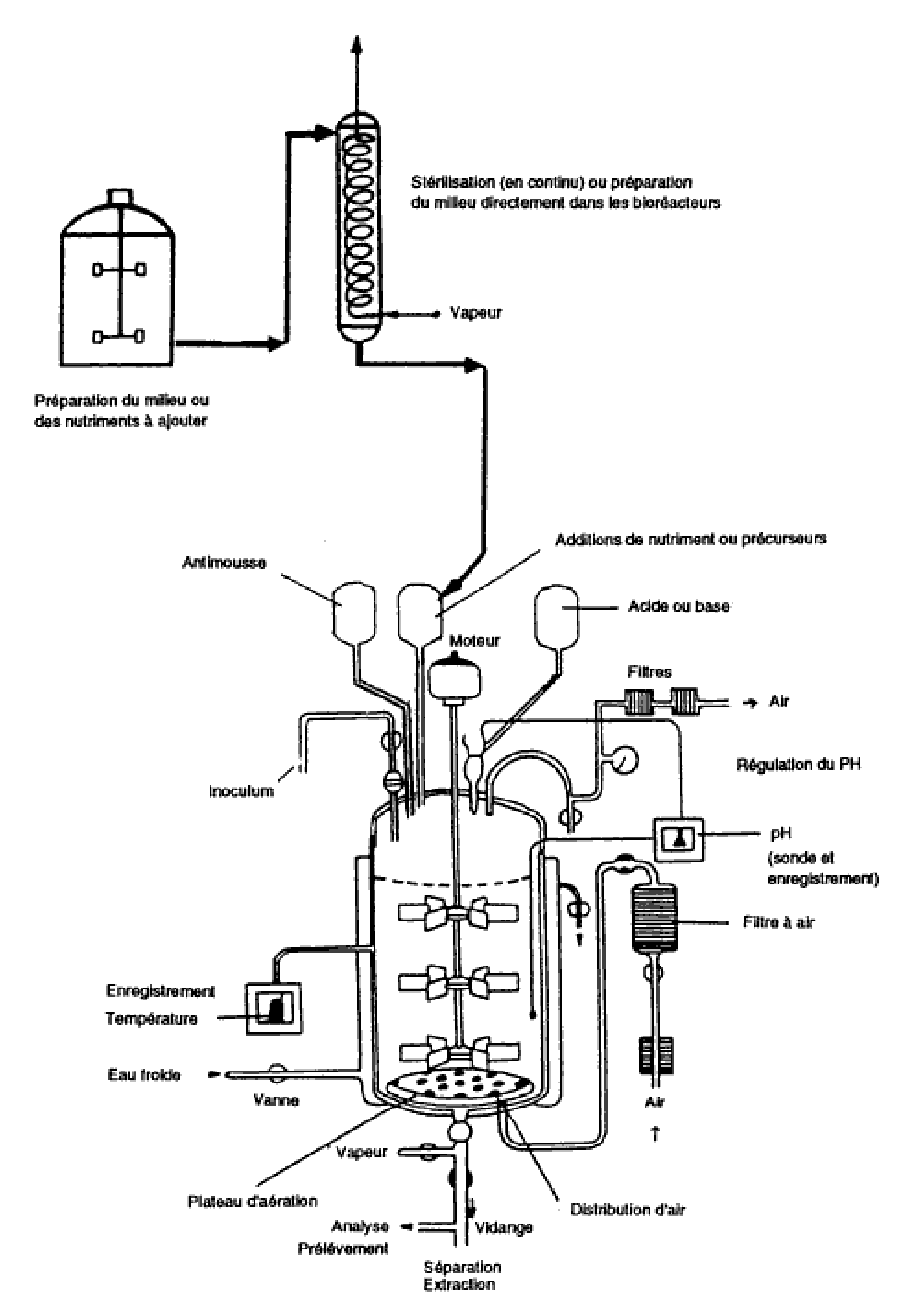


Figure III.34 – **Schéma d'un fermenteur en discontinu et de ses accessoires.**

Copyrighted material

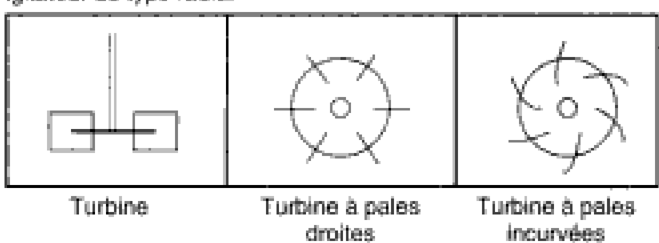


Figure III.35 – **Systèmes d'agitation de type radial.**

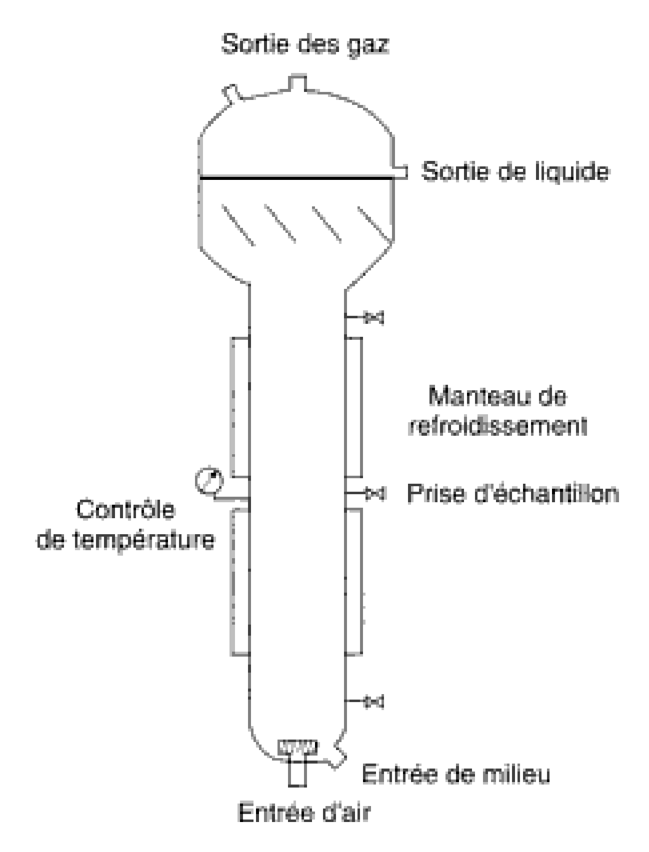


Figure III.36 – **Agitation par air *(air lift)* de type tower.**

– la **liaison covalente** qui, bien au point pour la fixation des enzymes, est moins utilisée pour les micro-organismes. Il s'agit d'une liaison chimique irréversible qui met en jeu notamment les groupements des chaînes latérales des acides aminés et un « ligand » fixé sur le support. Outre l'irréversibilité, ce système présente l'inconvénient d'utiliser comme ligand des réactifs souvent toxiques pour les micro-organismes ;

– la **floculation**, système par lequel on provoque l'agrégation des cellules, par exemple par l'addition de polyélectrolytes (chitosane). Elle met en jeu des liaisons hydrogènes et de Van der Waals. Elle est notamment utilisée dans le traitement des eaux résiduaires en « boues activées ».

Divers processus sont utilisés :

– **réacteurs à lit fixe** *(fig. III.38a)* : entassement des billes dans une colonne, l'aération et les divers contrôles étant effectués par un système externe ;

– **réacteurs à lit fluidisé** où l'on évite un colmatage des billes en ajustant leur densité et la vitesse d'écoulement, ceci permettant de meilleurs transferts de matière ;

– **réacteurs à fibres creuses** *(fig. III.38b)* : on fait circuler le milieu de culture au travers de fibres creuses où les cellules se développent ;

– **réacteurs à plaques semi-perméables**, voisin du précédent, les fibres étant remplacées par des membranes semi-perméables.

4.4.2. Mesure et contrôle des paramètres de culture

C'est un aspect fondamental des fermentations industrielles permettant d'arriver à une **optimisation** maximale des cultures. Tous les paramètres doivent être contrôlés, c'est-à-dire mesurés avec précision, et, pour certains, pilotables avec efficacité.

Leur mesure fait appel soit à des capteurs spécifiques, ou sondes, sensibles aux variations des paramètres à mesurer, soit à une technique externe après prélèvement d'un aliquot de culture.

Utilisant généralement un signal électrique, les sondes doivent être précisément calibrées, fiables et donner des renseignements exacts. Elles sont en général connectées au système de pilotage et de régulation de la culture.

L'utilisation *in situ* de ces sondes reste cependant très délicate : installation coûteuse et complexe (électrolytes, membranes à changer...), maintien de la stérilité. Bien souvent, on aura à s'orienter vers des systèmes de mesure après prélèvement et, ainsi, l'usage d'échantillonneurs automatiques pouvant effectuer plusieurs dosages à partir d'un seul prélèvement se répand de plus en plus.

La **régulation** est assurée par les divers systèmes imposant les paramètres choisis à la culture (chauffage-refroidissement, aération, agitation, adjonction d'acide ou de base, antimousse, etc.). Ces systèmes répondront aux indications des sondes en fonction de la valeur du paramètre qu'on leur aura indiqué (point de consigne, intensité et rapidité de la réponse).

Le *tableau III.12* indique les types de systèmes de mesure des paramètres physico-chimiques et leurs systèmes de régulation éventuelle. Le *tableau III.13* donne les principaux paramètres

Copyrighted material

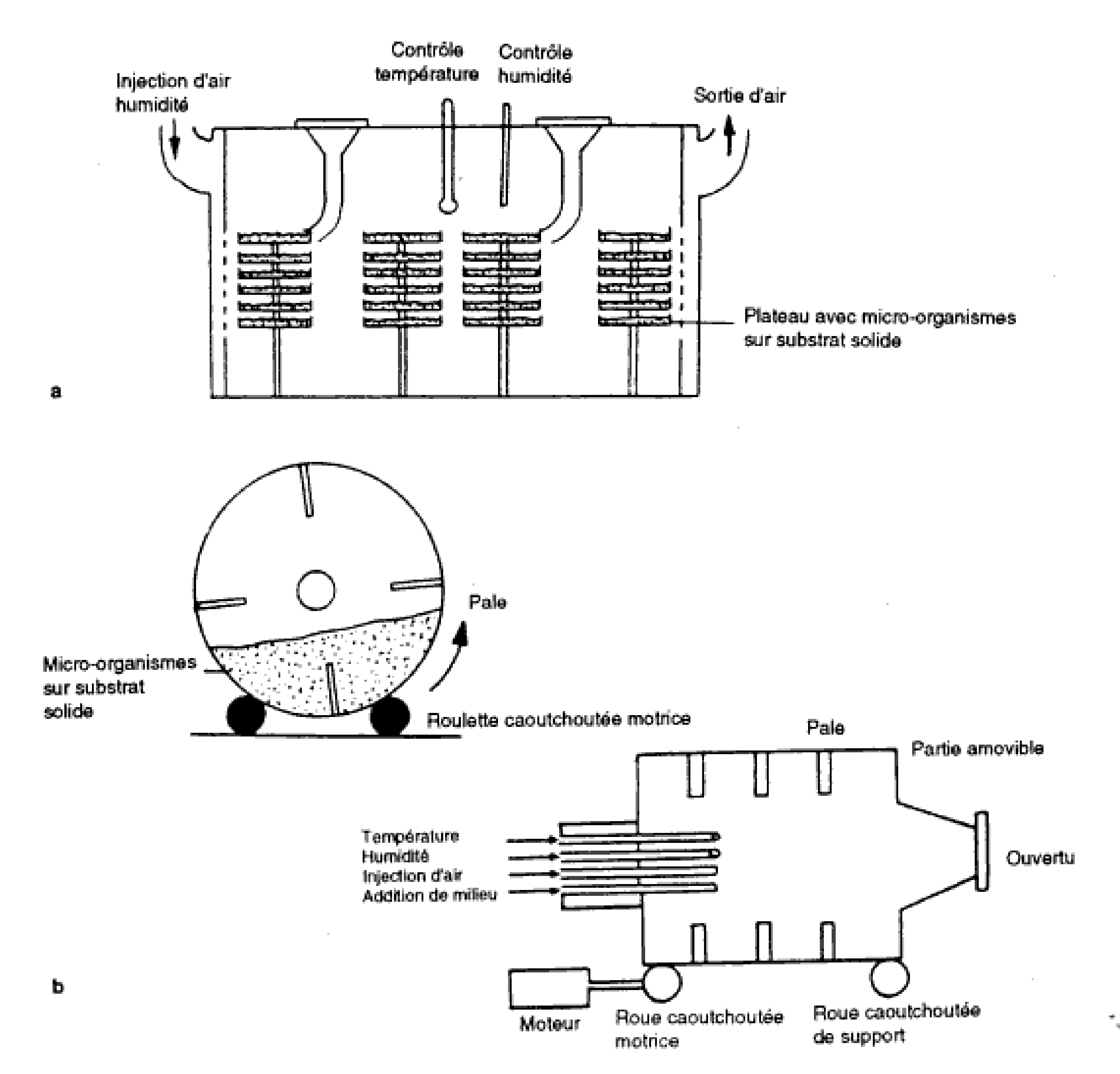


Figure III.37 – **Systèmes en phase solide.**
a : plateaux ; b : fermenteurs rotatifs.

biochimiques et biologiques mesurés et les techniques appropriées.

4.4.3. Phénomènes de transfert

L'aération, l'agitation, les transferts de chaleur et le contrôle de la formation des mousses représentent des éléments important de la réussite d'une culture en bioréacteur ; il est donc primordial de savoir les maîtriser correctement.

• L'**aération.** Le transfert correct de l'oxygène vers les cellules est un élément essentiel pour une fermentation industrielle. L'oxygène se dissout mal dans l'eau (maximum 10 mg.L^{-1}). Il faut donc en fournir en permanence en maîtrisant bien la façon dont il va être transféré aux cellules. Ce transfert « gaz-liquide » peut être évalué par la mesure d'un paramètre, le KLa, coefficient de transfert de masse volumétrique (exprimé en h^{-1}). Il varie en fonction du débit de l'aération, de la vitesse d'agitation, de la température et de la technique du bioréacteur. Il sera donc important de connaître au préalable comment ce paramètre évolue et, aussi, de le contrôler pendant la culture.

• L'**agitation**. Pour assurer une bonne optimisation de la culture, le facteur homogénéisation est essentiel. Il faut en effet assurer un accès optimal des cellules aux substrats et à l'oxygène, et éviter les mauvaises répartitions cellulaires. Il faudra donc prendre en considération le type d'agitation choisi en fonction des cellules, son intensité et la composition

Copyrighted material

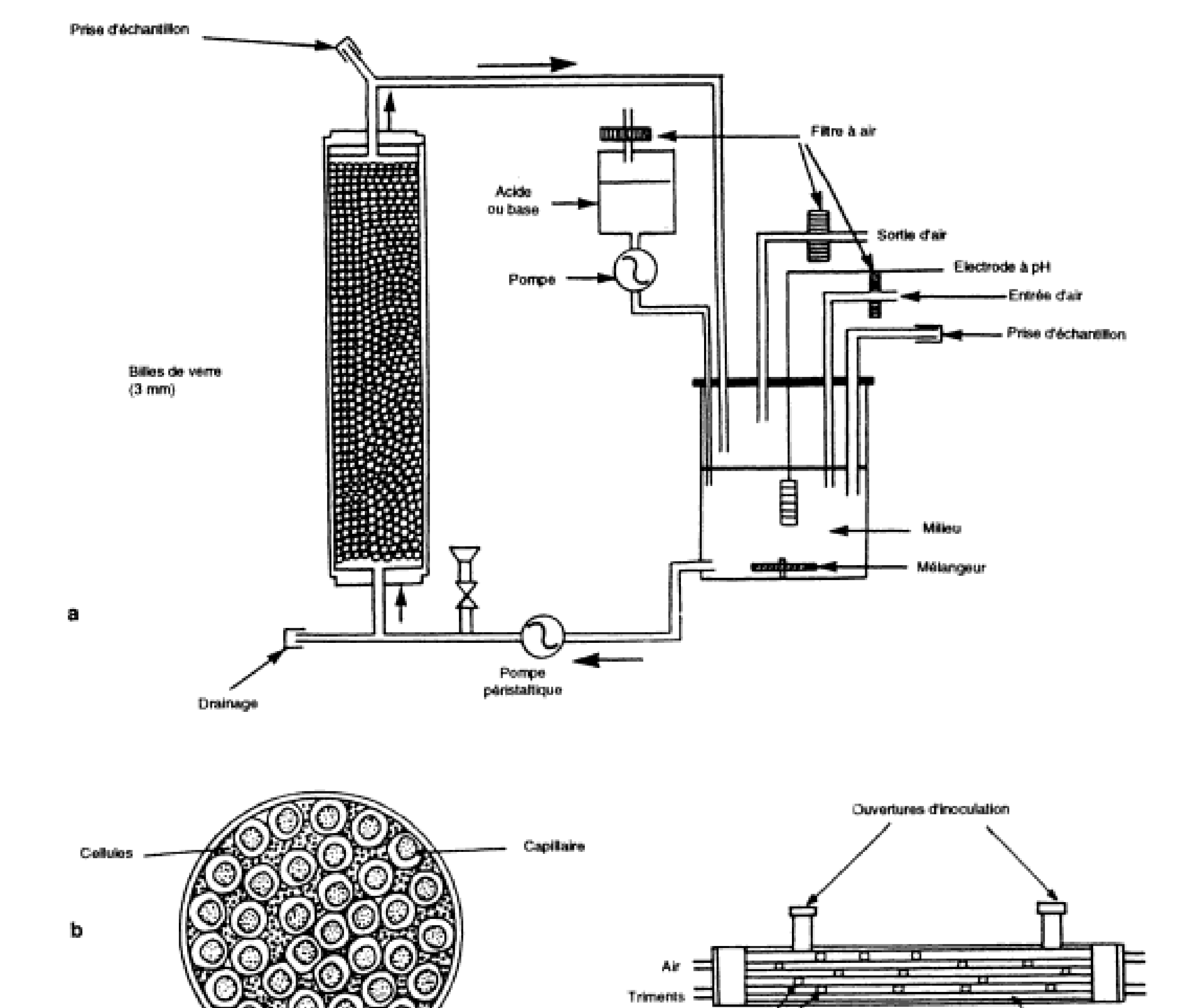


Figure III.38 – **Systèmes immobilisés.**

a : lit fixe ; b : fibres creuses.

physique du milieu (viscosité) qui pourra être amenée à se modifier (excrétion de polymères, développement de mycélium…). Ce facteur important peut être quantifié par un paramètre, le nombre de Reynold, fonction de la vitesse d'agitation, du diamètre du système d'agitation (pales), de la densité cellulaire du milieu et de sa viscosité.

- Le **transfert de chaleur**. Pour assurer en permanence aux cellules une température optimale, il est nécessaire non seulement de posséder un système de chauffage efficace mais aussi de permettre une élimination de la chaleur dégagée par les micro-organismes en mettant en place un système de refroidissement (voir § 4.4.2.). Le transfert de chaleur dépendra donc de la qualité de ces systèmes ainsi que de la géométrie de la cuve et des caractéristiques du milieu, de l'agitation et de l'aération. Ainsi, en présence de cellules fragiles pour lesquelles on sera obligé de diminuer la vitesse d'agitation, on sera amené à augmenter la hauteur de la cuve par rapport à son diamètre afin d'accroître la surface de contact entre le système de refroidissement et le milieu.

- Les **mousses**. Leur apparition dépend essentiellement de deux facteurs : la composition du milieu (protéines) et l'intensité d'aération. Comme elles empêchent l'élimination du CO_2 produit et risquent d'occasionner des débordements, il faut absolument les éliminer. On utilise pour cela des silicones ou

Copyrighted material

Tableau III.12 – Méthodes de mesure de principaux paramètres physicochimiques contrôlés et éventuellement régulés.

Paramètres	Capteurs	Actionneurs
Température	Thermomètre à résistance en platine	Résistance plongeante ou double enceinte à circulation d'eau chaude. Circuit d'eau froide commandé par électro-vanne
Agitation	Capteurs de proximité (électrique) ou de positionnement (optique)	Moteur électrique / axe / pales
Volume de milieu	piézo résistance	Vidange
Mousse	Sonde à résistance électrique	Injection d'anti-mousse
Viscosité	Viscosimètre	
pH	Électrode	Injection acide ou base par pompe péristaltique
O_2 dissout	Électrode type électrode de Clark	Aération
CO_2 dissout	Électrode type pH avec solution de tampon bicarbonate	
Ions	Électrodes sélectives	
Gaz à la sortie	Analyseur paramagnétique (O_2), analyse infra-rouge (CO_2)	

Tableau III.13 – Méthodes de mesure des paramètres biochimiques.

Systèmes de mesure	Paramètres mesurés
Électrodes spécifiques à enzyme immobilisée	Glucose (glucose-oxy dase), urée (uréase), acide aminé (décarboxylase), acétylcholine (estérase)
Fluorimétrie en sortie sur prélèvement	NADH + H^+, NADPH + H^+ (voir § 3.1.3.)
Bioluminescence en sortie sur prélèvement	ATP (voir § 3.1.3.)
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) en sortie	Composés volati ls (éthanol, arômes), lipides
Chromatographie à haute pression en phase liquide (HPLC) en sortie	Molécules orga niques en solution
Examen microscopique en sortie sur un prélèvement	État de la sou che, éventuels contaminants (modification par addition éventuelle d'antibiotique)
Dénombrement des micro-organismes en sortie sur un prélèvement	Hématimètre, dén ombrement en milieu solide (voir § 3.1.1.)
Biomasse en sortie sur un prélèvement	Absorbance, poids sec (voir § 3.1.2.)

des huiles, en s'étant assuré préalablement que ces produits n'ont pas d'influence sur les cellules. Les quantités à rajouter peuvent être contrôlées par l'intermédiaire d'une sonde détectrice (voir § 4.4.2.) couplée à un système de contrôle et à un système d'injection automatique.

4.4.4. Cinétique d'apparition des produits, quantification

La cinétique d'apparition des produits de fermentation peut être quantifiée de la même manière que l'évolution de la biomasse. On exprime :

Copyrighted material

– la vitesse volumique de production, notée rp (*d*P/*dt*) et exprimée en $g.L^{-1}.h^{-1}$;

– la vitesse spécifique de production, notée Q_P, d'expression *d*P/*dt* × 1/X, c'est-à-dire vitesse de production rapportée à la biomasse.

Cette cinétique va dépendre des produits formés. On distingue généralement trois cas :

– les produits dits **associés** (sous-entendu, associés à la croissance), c'est-à-dire dont l'apparition dans le milieu est concomitante à l'évolution de la biomasse (courbe *a* de la *fig. III.39*). C'est le cas de la production d'éthanol lors de la fermentation alcoolique. Dès sa formation, celui-ci est exocyté dans le milieu ;

– les produits dits non associés, appelés aussi **métabolites secondaires**, c'est-à-dire dont l'apparition se manifeste en phase stationnaire. Ils ne sont libérés dans le milieu que lors de la lyse cellulaire (courbe *b* de la *fig. III.39*). C'est le cas, notamment, des antibiotiques et des vitamines ;

– les produits **mixtes** ou **intermédiaires**, apparaissant dans le milieu au cours de la phase exponentielle (courbe *c* de la *fig. III.39*).

En termes de bilan, l'apparition des produits de fermentation peut être exprimée de trois manières :

– la **productivité** volumique horaire, masse de produit apparu par unité de volume de milieu et par unité de temps ($g.L^{-1}.h^{-1}$) ;

– si l'on ramène l'évaluation de la productivité au volume total du milieu, on exprime alors la **productivité horaire globale** ($g.L^{-1}.h^{-1}$) ;

– le **rendement total** par rapport au substrat principal, noté R_P/S : rapport de la masse de produit formé sur la masse de substrat utilisé à la fin du processus. On le désigne aussi sous le nom de rendement **de conversion**.

4.4.5. Exemples d'application

Le *tableau III.14* présente les principales applications actuelles des fermentations industrielles. Il se veut volontairement non exhaustif. Il se limite à quelques exemples illustrant les applications industrielles des cultures de micro-organismes. Le cas particulier d'utilisation de micro-organismes génétiquement transformés sera envisagé au chapitre VI et celui concernant la fabrication de vaccins au chapitre VII.

Une remarque particulière doit être faite sur ce que l'on appelle les **biotransformations** (ou **bioconversions**). Il s'agit de processus utilisant les micro-organismes pour réaliser, dans de meilleures conditions et avec un meilleur rendement, des réactions chimiques permettant de « transformer » des molécules biologiquement actives afin d'en améliorer l'activité, la spécificité, ou d'en changer le spectre d'action.

On utilise pour ce faire les particularités enzymatiques des micro-organismes que l'on cultive selon les techniques évoquées plus haut. Le micro-organisme sera utilisé tel quel (en milieu liquide ou immobilisé), ou alors on travaillera sur un extrait, voire même sur une préparation enzymatique purifiée.

Le *tableau III.15* donne quelques exemples pris parmi les bioconversions d'antibiotiques.

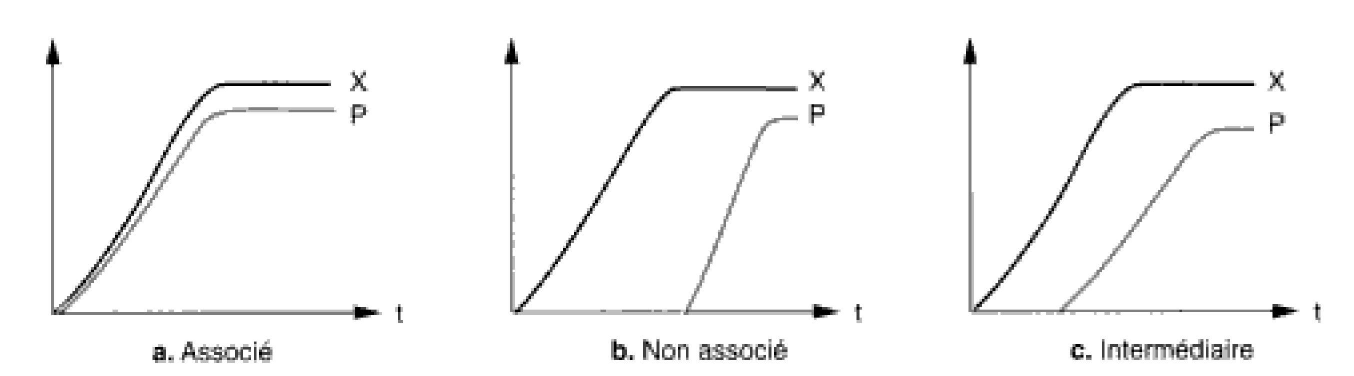


Figure III.39 – Cinétiques de formation du produit ; associé, non associé, intermédiaire.

Copyrighted material

Tableau III.14 – Exemples d'application des fermentations industrielles.

Productions	Micro-organismes	Milieux de culture	Productions	Utilisations
Biomasse : Protéines alimentaires	*Methylophilus methylotrophus* *Ca. utilis* *Fusarium graminearum* *Pe. cyclopium*	Méthanol Ethanol Amidon Lactosérum	 10 000 t/an 100 t/an 300 t/an	Alimentation animale Additif alimentaire Alimentation humaine Alimentation animale
Métabolites primaires : Acides aminés Ac. glutamique Thréonine	 *C. glutamicum* *B. subtilis*	 Mélasses Mélasses	 370 000 t/an 160 t/an	 66 % Alim. humaine 33 % Alim. animale 1 % Domaine médical
Acides organiques Ac. acétique Ac. citrique Ac. lactique Ac. gluconique	 *Acetobacter aceti* *Aspergillus niger* *Lactobacillus delbrueckii* *A. Niger*	 Éthanol, vin Mélasses Lactosérum	 300 000 t/an 400 000 t/an 40 000 t/an 45 000 t/an	 Vinaigre 60 % Alimentation (acidulant, émulsifiant, anti-oxydant) 10 % Indus. pharmaceutique et cosmétique Acidifiant alimentaire Stabilisant produits carnés
Biofuel : Éthanol	 *Sc. cereviseae* *Cl. thermocellum*	 Amidon de céréales Mélasses canne à sucre Cellulose	 10 M t/an (Brésil)	 Biocarburant, solvant
Lipides :	*A. fumigatus* *Mucor miehi* *Pe. spinulosum*	Maltose Glucose Mélasse	2 500 t/an 1 200 t/an 8 t/an	Alimentation
Nucléotides : 5' IMP 5' GMP ATP	 *B. subtilis* *B. ammoniagenes* *B. ammoniagenes*	 Caséine, extrait lev. Guanine, biotine Adénine, glucose		
Polysaccharides : Dextrane Xanthane Alginate	 *Leuconostoc mesenteroïdes* *Xanthomonas campestris* *Azotobacter vinelandii*	 Saccharose 10-15 % Amidon Saccharose 8 g · L^{-1}	 191 t/an 610 t/an 60 000 t/an	 Alimentation (gélifiants), Pétrochimie (émulsifiants), Adhésifs, immobilisation de cellules ou d'enzymes
Vitamines : B 12	 *Propionibacterium shermanii* *Ps. denitrificans*	 « Corn steep », glucose Mélasse betterave, extrait de levure		 36 % Pharmacie 64 % Additifs alimentaire
B 2 Précurseur vit. C	*Eremothecium sahbyii* *Acetobacter suboxydans*	Glucose, urée Sorbitol 20 %		

Copyrighted material

Tableau III.14 – Exemples d'application des fermentations industrielles (suite).

Productions	Micro-organismes	Milieux de culture	Utilisations
Pigments : ß-carotène	*Blakeslea trispora* *Rhodotorula gracilis*	Maïs broyé, farine de soja Mélasse betterave	Colorants
Métabolites secondaires : Antibiotiques (voir Chap. V) Pénicillines Rifamycine	 *Pe. chrysogenum* *Amycolata mediterranei*	 « Corn steep », glucose, lactose Farine de soja, glucose	 Thérapeutique
Produits pharmacologiquement actifs Ergotamine Valiomaline Compactine Cyclosporine	 *Claviceps purpura* *Streptomyces hygroscopicus* *Pe. citrinum* *Tolypocladium inflatum*		 Migraines Diabète Cholestérol Immunosupresseur
Arômes Anisaldéhyde Geraniol Méthylphénylacétate	 *Trametes suavolens* *Ceratiocystis variospora* *Trametes odorata*		 Anis Rose Miel
Insecticides Toxine	 *B. thuringiensis*	 Farine de coton, Glucose, peptone	 Anti-lepidoptère, diptère
Hormones végétales Gibberellines	 *Phaecosphaeria sp.*	 Sirop de maltose, farine de soja	 Suppression de la dormance, floraison
Enzymes : amylase ß glucanase ß galactosidase Cellulase Invertase Catalase Pectinases	 *B. subtilis, A. niger* *B. subtilis, A. niger* *A. niger, Ca. pseudotropicalis* *A. niger, Trichoderma reesii* *Sc. cereviseae* *A. niger, Micrococcus lysodeikticus* *A. niger, Trichoderma reesii*	En général : Source de C : Farine de céréales de soja, amidon de pomme de terre, de riz, de son, mélasse Source de N : Farine de poisson, gélatine, farine de soja, de son, peptones Facteurs de croissance : Extrait de levure, « corn steep »	 Production glucose, alcool Brasserie Suppression lactose du lait Hydrolyse cellulose Hydrolyse saccharose Stérilisation lait, beurre Clarification jus de fruits, vin

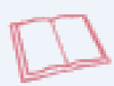
Copyrighted material

Tableau III.15 – Bioconversions d'antibiotiques

Réactions de transformation	Micro-organismes	Substrats	Produits
Hydrolyse de :			
ß lactames	*Ps. aeruginosa*	Pénicilline	Ac. pénicillanique
Peptides	*Alcaligenes spp.*	Novobiocine	Novenamine
Acylation	*Stm. griseus*	Chloramphénicol	Chloramphénicol 3 acétate
Phosphorylation	*B. circulans*	Kanamycine	Kanamycine 3 ortho-phosphate
Sulfoxydation	*Stm. armentosus*	Lincomycine	Lincomycine sulfoxyde

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

1. Définir la notion de nutriment.

2. Inventorier les nutriments indispensables : sels minéraux, sources de carbone, d'azote, d'énergie.

3. Illustrer par des exemples la diversité des substances minérales et organiques dont l'oxydation conduit à la production d'énergie.

4. Définir un milieu minimal.

5. Dégager, à partir des exigences nutritives minimales d'un micro-organisme, les notions d'autotrophie, d'hétérotrophie, de facteur de croissance et de facteur limitant. Définir et expliciter ces termes.

6. Citer les catégories de biomolécules pouvant être des facteurs de croissance pour les bactéries auxotrophes.

7. Donner le principe des dosages microbiologiques des vitamines.

8. Définir les termes milieu de culture, milieu synthétique, milieu empirique.

9. En mobilisant les connaissances acquises en classe de première :
– citer les principaux ingrédients des milieux empiriques les plus usuels et préciser leur rôle ;
– donner des exemples de milieux enrichis et leurs principales indications ;
– définir le terme « milieu sélectif », reconnaître les agents sélectifs, indiquer leur mode et leur spectre d'action et en déduire le domaine d'utilisation.

10. Décrire les phénomènes morphologiques accompagnant la division d'une bactérie.

11. Définir le terme « colonie ».

12. Présenter succinctement les deux systèmes de reproduction des levures et des moisissures asexuées et sexuées. Souligner l'intérêt de cette étude pour l'identification des principaux champignons d'intérêt alimentaire et médical.

13. Montrer comment il est possible d'obtenir et de maintenir des souches pures.

14. Présenter les techniques permettant d'évaluer le nombre ou la masse des bactéries présentes dans un milieu de culture liquide.

15. Définir les paramètres d'état de la croissance en milieu non renouvelé.

16. Expliquer comment on établit expérimentalement une courbe de croissance.

17. À partir de données expérimentales, tracer une courbe de croissance et repérer les différentes phases. En expliquer la signification physiologique.

18. Déterminer par l'analyse mathématique et graphique les paramètres d'état de la croissance.

19. Analyser l'influence de la température et du pH sur la croissance.

20. Définir les termes psychrophile, mésophile et thermophile.

21. Appliquer ces connaissances à la compréhension du processus d'altération des aliments et des principes des techniques de conservation ou de stabilisation des denrées (en liaison avec le chap. V).

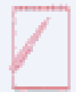
22. Analyser l'influence de l'Aw sur la croissance des micro-organismes.

23. Expliquer le rôle stabilisateur de la dessiccation des aliments (en liaison avec le chap. V).

24. Analyser l'influence de la concentration en substrat sur les paramètres d'état de la croissance et sur les valeurs de la biomasse obtenue.

25. Décrire le phénomène de diauxie.

26. Décrire le principe de fonctionnement d'un chémostat, d'un fermenteur industriel.



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes.

1. Les micro-organismes.................................. puisent leur énergie dans le rayonnement lumineux et sont appelés aussi.................................

2. Dans le phénomène de............................., un micro-organisme prototrophe cultivé sur milieu minimum élabore une substance servant de.............................. à un autre micro-organisme que l'on peut alors cultiver en même temps sur le même milieu. On observe alors, sur milieu solide, un phénomène de..........................

3. L'……….. est un paramètre quantifiant l'activité de l'eau, c'est-à-dire sa disponibilité. L'eau agit comme………………….. des nutriments et comme…………………………du métabolisme.

4. Le……………………………………… exprime le temps nécessaire à un doublement de la population bactérienne ou de la biomasse. En théorie, il exprime aussi le……………………………………………………………

5. Si, lorsque l'on trace la courbe $X = f(t)$, on obtient une ligne continue, cela est dû au fait que, au niveau d'une population bactérienne, la croissance est………………………………, toutes les cellules n'étant pas potentiellement capables de se diviser en même temps. Si elles l'étaient, l'on obtiendrait une courbe en……………………….. caractéristique d'une croissance………………………..

6. Dans la technique de dénombrement cellulaire par culture sur milieu solide, on appelle……….. (……………………………….) une colonie car elle n'est pas forcément issue d'une cellule……………………

7. La détermination de la biomasse par mesure du trouble, ou………………………………, est fondée sur le fait que…………………………… de lumière par le milieu de culture est…………………………………………… au nombre de cellules présentes.

8. La…………………………………….. constitue la période essentielle de la croissance où le…………………………. et le…………………………., paramètres caractéristiques du micro-organisme, peuvent être définis et déterminés, car c'est lors de cette phase que la vitesse spécifique de croissance est constante et………………

9. Si le principe de croissance continue «……………. » se caractérise par un maintien de la culture à biomasse constante et taux de croissance maximum, le système «…………………………. », lui, introduit un facteur limitant permettant de jouer sur le…………………………….

10. Dans un système de culture…………………………. (…………… en anglais), on apporte de façon contrôlée des nutriments en cours de culture sans rien enlever. Dans une culture………………….., on apporte un volume de milieu neuf équivalent à ce que l'on………… du…………

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. Le terme d'auxotrophe désigne les micro-organismes capables de se développer avec du CO_2 comme seule source de carbone.

2. Le terme « facteur de croissance » désigne une substance qui doit entrer impérativement dans la composition d'un milieu de culture destiné à étudier la croissance des micro-organismes.

3. La détermination du nombre de cellules par la technique de culture sur milieu solide utilisant la méthode des dilutions ne dénombre que les germes viables à l'exclusion des cellules mortes.

4. Les expressions « vitesse spécifique de croissance » et « taux de croissance » sont équivalentes.

5. Le terme « facteur limitant » désigne une substance dont l'influence sur la croissance sera effective en deçà d'une certaine concentration au-delà de laquelle cette substance demeurera sans effet aucun.

6. Lorsqu'un micro-organisme est capable, lors de sa croissance, d'utiliser deux substrats carbonés en même temps, on parle de phénomène de diauxie.

7. L'avantage d'une culture en continu réside dans le fait que l'on peut assurer une croissance indéfinie simplement en éliminant régulièrement une fraction de la biomasse afin de ne jamais atteindre la phase stationnaire.

8. Un milieu d'enrichissement est un milieu liquide destiné à favoriser la croissance d'un micro-organisme au détriment de celle des autres, en agissant sur vitesse spécifique de croissance.

9. Lors de la congélation d'une souche bactérienne, il est conseillé de descendre en température le plus rapidement possible. Au contraire, lors de la remise en culture, le procédé de décongélation doit être très lent.

10. Le terme « bioréacteur » doit être préféré à « fermenteur », car une culture de micro-organismes n'est pas forcément destinée à produire un métabolite par voie fermentaire.

3. Nutrition et croissance de *Yersinia pestis*

1. Comportement nutritionnel.

1.1. *Y. pestis* est une bactérie chimio-organotrophe et hétérotrophe. Définir ces termes.

1.2. La culture de cette bactérie nécessite la présence de nicotinamide dans le milieu. Comment appelle-t-on une telle bactérie ?

2. Croissance.

On prélève à différents temps notés t_1, t_2, t_3 et t_4, 1 cm^3 d'une culture en milieu liquide de *Y. pestis*. Soit t_1 en phase de latence, t_2 en phase exponentielle, t_3 en phase stationnaire et t_4 en phase de déclin.

2.1. Schématiser l'allure d'une courbe de croissance en milieu liquide non renouvelé, en précisant les paramètres portés en abscisse et en ordonnée.

2.2. Sur cette courbe, localiser les temps t_1, t_2, t_3 et t_4.

4. Nutrition et dosage microbiologique chez *Bacillus subtilis*

1. Nutrition.

B. subtilis est une bactérie hétérotrophe. On désire cultiver une souche d'un mutant auxotrophe pour le tryptophane (notée Trp^-) de *B. subtilis*. On dispose de 2 milieux minima dont les compositions sont données dans le tableau ci-dessous.

Milieu 1		Milieu 2	
Chlorure d'ammonium	1,00 g	Chlorure d'ammonium	1,00 g
Monohydrogénophosphate de potassium	1,00 g	Monohydrogénophosphate de potassium	1,00 g
Sulfate de magnésium	0,20 g	Sulfate de magnésium	0,20 g
Sulfate de fer	0,01 g	Sulfate de fer	0,01 g
Chlorure de calcium	0,01 g	Chlorure de calcium	0,01 g
Eau distillée	1,00 L	Glucose	5,00 g
Dioxyde de carbone	En quantité suffisante	Eau distillée	1,00 l

1.1. Définir un milieu minimum.

1.2. Lequel des deux milieux convient à cette souche et sous quelle condition pourra-t-elle cultiver ? Justifier les réponses en définissant les termes hétérotrophe et auxotrophe.

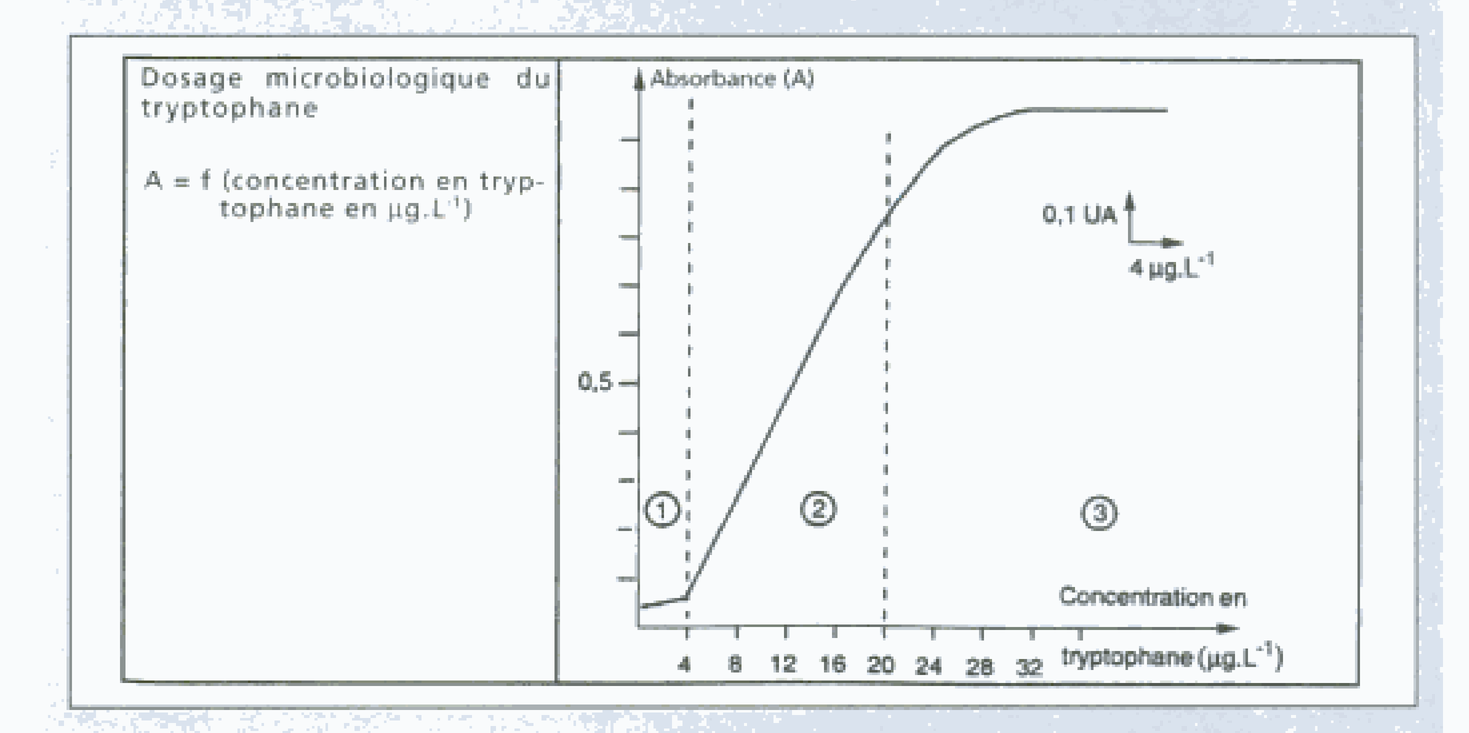
1.3. Nommer et définir le type trophique de micro-organisme qui pourrait cultiver sur l'autre milieu.

1.4. Justifier la présence dans ces milieux de chlorure d'ammonium et de sulfate de magnésium.

2. Dosage microbiologique du tryptophane.

2.1. Proposer un protocole pour doser cet acide aminé afin d'obtenir le graphe de la figure ci-dessous.

Quelle doit être la particularité du milieu de culture ?



2.2. Pourra-t-on utiliser la souche mutante de *B. subtilis* pour ce dosage ? Justifier.

2.3. Quelle est la caractéristique de la partie 2 de la courbe ? En justifier l'intérêt pour le dosage.

Comment peut-on qualifier le tryptophane dans cette partie ?

5. Étude de la croissance d'une souche d'*Acetobacter*

On étudie la croissance d'une souche d'*Acetobacter*.

1. Décrire une technique qui permette d'étudier l'évolution de la population bactérienne en fonction du temps.

2. La souche d'*Acetobacter* est cultivée dans un milieu liquide contenant les substrats appropriés et de l'acide para-aminobenzoïque (PAB), indispensable à cette bactérie. Le tableau ci-dessous donne le nombre de bactéries par unités de volume (N) à différents temps de culture :

t (heures)	N
0	10^5
1	10^5
2	10^5
3	10^5
4	$1{,}38.10^5$
5	$2{,}51.10^5$
6	$5{,}75.10^5$
7	$1{,}32.10^6$
8	$3{,}02.10^6$
9	$6{,}92.10^6$
10	$1{,}51.10^7$
11	$2{,}51.10^7$
12	$3{,}63.10^7$
13	$4{,}17.10^7$
14	$4{,}57.10^7$
15	$5{,}01.10^7$
16	$5{,}25.10^7$
17	$5{,}25.10^7$

2.1. Tracer la courbe LnN = *f (t)* en justifiant le choix de l'ordonnée LnN plutôt que N (échelle : 1,5 cm = 1 h en abscisse).

2.2. Indiquer, sur cette courbe, les différentes phases de la croissance.

2.3. Écrire la relation existant entre LnN_t (logarithme N au temps *t*) et LnN_{t+G} (logarithme de N au temps *t* + G, G étant le temps de génération, *t* et *t* + G étant pris en phase exponentielle de croissance).

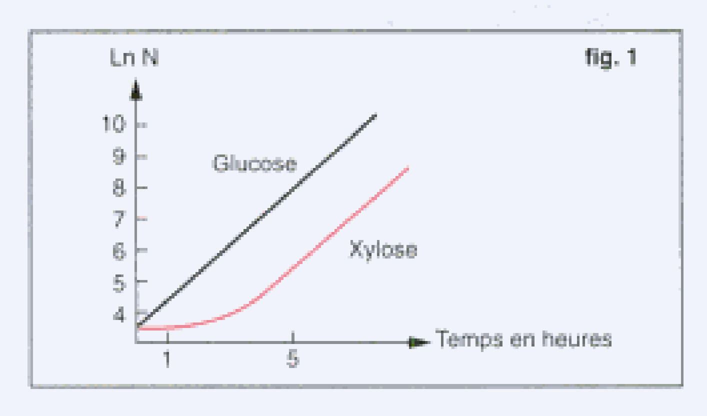
2.4. Mesurer directement sur la courbe tracée le temps de génération.

2.5. Calculer le taux de croissance $\mu_{x\ expo}$ (on prendra Ln2 = 0,7).

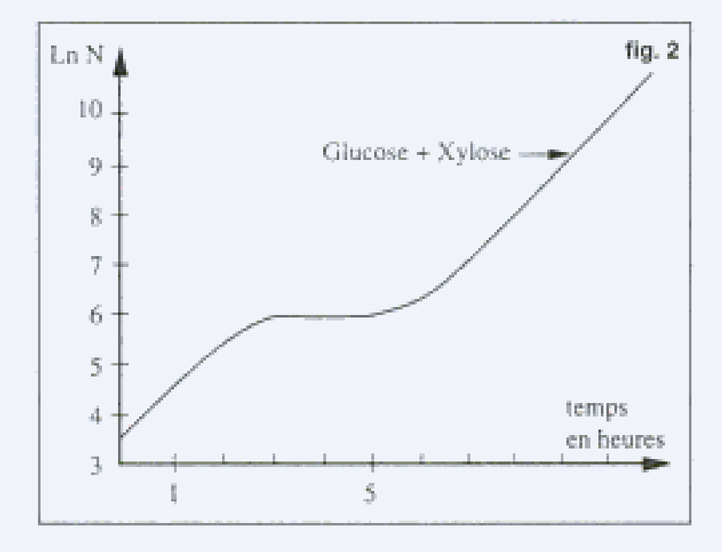
2.6. Vérifier la concordance des réponses 2.4. et 2.5.

6. Croissance et métabolisme glucidique

1. On suit la croissance d'*E. coli* sur un milieu synthétique non renouvelé en évaluant la population bactérienne au spectrophotomètre. La figure 1 ci-dessous montre la croissance de cette bactérie sur milieu synthétique contenant soit du glucose, soit du xylose, l'*inoculum* provenant d'une culture en phase exponentielle prélevée sur milieu contenant du glucose. Commenter l'allure des courbes.



2. À partir de la culture en phase exponentielle en milieu synthétique glucosé, on inocule le milieu synthétique additionné de glucose et de xylose. La croissance s'effectue selon la courbe de la figure 2. Commenter l'allure de cette courbe.



7. Étude de la croissance en milieu liquide de *Salmonella anatum*

1. On étudie la croissance de *S. anatum* en bouillon nutritif ordinaire. On obtient les résultats suivants (N est le nombre de bactéries par millilitre de milieu) :

t (heure)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LnN	4,60	4,60	4,60	4,80	5,60	6,70	7,70	8,75	9,80	10,80	11,85	12,90

t (heure)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
LnN	13,95	14,95	16,00	16,90	17,26	17,26	17,26	17,26	17,15	16,35	15,10	14,05

1.1. Tracer la courbe LnN = *f (t)*. Échelle : 1 cm = 1 U Ln et 1 cm = 1 h.

1.2. Dégager les différentes phases de la croissance, leur durée et leur signification physiologique.

1.3. Calculer $\mu_{x\ expo}$ et le temps de génération (G) de la bactérie.

2. Cette bactérie est cultivée dans les mêmes conditions que précédemment mais en bouillon trypticase-soja.

2.1. Expliquer comment varient alors $\mu_{x\ expo}$ et G par rapport à leur valeur précédente.

2.2. Proposer, sur le même graphique, un tracé de la courbe de croissance dans ce cas et justifier son allure générale.

8. Besoins nutritionnels d'une bactérie

Afin d'étudier les besoins nutritionnels de trois souches, A, B et C, on les ensemence sur les trois milieux suivants.

• Milieu 1 = milieu de base :

Composants	Quantités
K_2HPO_4	1 g
NO_3K	0,5 g
$MgSO_4,7H_2O$	0,2 g
$CaCl_2$	0,1 g
NaCl	0,1 g
$FeCl_3$	0,01 g
Eau distillée	1 litre

On ajoute à ce milieu de base stérilisé à l'autoclave 1 g de glucose stérile.

• Milieu 2 = milieu 1 + 4 g d'hydrolysat de caséine.

• Milieu 3 = milieu 1 + 4 g d'hydrolysat de caséine + 2 g d'extrait de levure.

Les résultats obtenus après incubation, sont les suivants :

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Souche A	+	+	+
Souche B	–	+	+
Souche C	–	–	+

1. Indiquer le rôle des constituants des milieux 1, 2 et 3.

2. Déduire des résultats les besoins nutritionnels des souches A, B et C.

3. Dans certains cas, une vitamine peut être dosée par son effet sur la croissance d'une bactérie.

3.1. Quelle caractéristique doit posséder la bactérie utilisée ?

3.2. Donner le principe du dosage.

3.3. Quel est l'intérêt d'un tel dosage.

9. Analyse des types trophiques de souches bactériennes

Analyse des types trophiques des souches I et II à l'aide des milieux de culture A, B et C (la composition des milieux est donnée en $g \cdot L^{-1}$).

Milieu A	
Phosphate d'ammonium	0,2
Phosphate monopotassique	1
Sulfate de magnésium	0,2
Chlorure de calcium	0,1
Chlorure de sodiu	5
Milieu B	
Milieu A + Citrate trisodique	2
Milieu C	
Milieu A + les additifs suivants	
Biotine	10^{-6}
Histidine	10^{-5}
Méthionine	2.10^{-5}
Thiamine	10^{-6}
Pyridoxine	10^{-6}
Acide Nicotinique	10^{-6}
Tryptophane	2.10^{-5}
Pantothénate de calcium	10^{-5}
+ Oligo-éléments	
+ Glucose	5

On obtient les résultats suivants après ensemencement et incubation.

Souche pure	Milieux*		
	A	B	C
I	–	+	+
II	–	–	+

* + culture ; – absence de culture.

1. 1. Comment qualifier le milieu A ?

1.2. Certaines bactéries pourraient se développer dans le milieu A à la condition de les incuber en atmosphère enrichie en CO_2. Expliquer pourquoi et donner leur type trophique vis-à-vis du carbone.

2.1. Quel est le type trophique « vis-à-vis du carbone et des besoins nutritionnels spécifiques » de la souche I ?

2.2. Quelle est sa source d'azote ?

2.3. Il est recommandé de ne pas ensemencer le milieu B à partir d'un bouillon ou d'une eau peptonée mais à partir d'une colonie sur milieu gélosé. Expliquer pourquoi. Quel milieu gélosé de même composition que B connaissez-vous ?

3.1. Qu'apporte le glucose dans le milieu C ?

3.2. Quel est le type trophique vis-à-vis du carbone et par rapport au métabolisme énergétique ?

3.3. Définir et expliquer la présence d'oligoéléments.

3.4. Quel oligoélément est indispensable pour que *Corynebacterium diphteriae* puisse produire sa toxine ?

3.5. Les composants additifs du milieu C appartiennent à deux groupes chimiques distincts. Lesquels ?

Copyrighted material

3.6. À quelle catégorie appartiennent ces composants ? Donner une définition.

4. Le milieu C gélosé (dépourvu de glucose) est utilisé pour l'étude de l'assimilation des sucres.

4.1. Comment s'appelle ce test d'identification ?

4.2. Avec quel micro-organisme utilise-t-on cette recherche ?

5. On contamine 5 mL de milieu B avec 10^6 staphylocoques et 10^2 bactéries appelées souche II dans l'expérience précédente.

5.1. Quel est le nombre, par millilitre, de bactéries de chaque souche au temps 0 ?

5.2. Après 6 heures d'incubation sans phase de latence, on dénombre séparément 8.10^8 staphylocoques par millilitre et 3.10^3 souches II par millilitre. Calculer le temps de génération des deux germes.

5.3. Comment expliquez-vous ce résultat ?

5.4. Comment s'appelle ce phénomène ? Comment se manifeste-t-il sur milieu gélosé ?

10. Étude de la croissance de *Salmonella typhi murium* en fonction du tryptophane

On détermine le taux de croissance d'une souche de *S. typhi murium* dans un milieu minimum de culture additionné de solutions de tryptophane de concentrations croissantes.

Les résultats expérimentaux après 18 heures d'incubation à 37 °C sont présentés dans le tableau suivant.

Tube de culture	Tryptophane ($mg \cdot L^{-1}$)	$\mu_{x\ expo}$ (h^{-1})
1	0	0,00
2	6	0,01
3	9	0,22
4	12	0,70
5	15	1,20
6	18	1,60
7	21	2,05
8	24	2,50
9	27	2,80
10	30	2,80

1. Tracer la courbe $\mu_{x\ expo}$ en fonction de la concentration en tryptophane du milieu (échelle : 1 cm = 2 $mg \cdot L^{-1}$ et 1 cm = 0,2 h^{-1}).

2. Commenter et interpréter cette courbe.

3. Que représente le tryptophane pour *S. typhi murium* ? Citer deux substances appartenant à des groupes biochimiques différents et jouant un rôle analogue à celui du tryptophane vis-à-vis d'autres bactéries.

4. En déduire le type trophique de *S. typhi murium*.

5. On reproduit l'expérience dans les mêmes conditions en remplaçant la solution de tryptophane (1 mL par tube) par 1 cm^3 d'un hydrolysat protéique. En phase exponentielle de croissance on dénombre :

– au temps 6 h : $6,31.10^6$ bactéries par mL ;

– au temps 8 h : $8,47.10^7$ bactéries par mL.

Calculer le taux de croissance et le temps de génération de la souche après avoir défini ces paramètres (on prendra Ln2 = 0,7).

11. Nutrition et croissance des lactobacilles

La confection d'un certain nombre de milieux de culture (M_1, M_2, M_3 et M_4) a permis de définir les exigences nutritionnelles de *Lactobacillus casei*.

La composition des milieux est indiquée ci-dessous :

Ingrédients	M_1	M_2	M_3	M_4
Communs				
Eau	1 litre	1 litre	1 litre	1 litre
K_2HPO_4	1 g	1 g	1 g	1 g
$MgSO_4, 7H_2O$	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
$FeSO_2, 7H_2O$	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
$CaCl_2$	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Sels (Mn, Mo, Cu, Co, Zn)	0,02-0,05 mg de chacun	0,02-0,05 mg de chacun	0,02-0,05 mg de chacun	0,02-0,05 mg de chacun
Ajoutés				
Extrait de levure				5 g
Glucose		5 g	5 g	5 g
NH_4Cl	1 g	1 g	1 g	
Acide folique			0,1 mg	
Pyridoxal			0,1 mg	

1. Analyser les milieux M_1, M_2 et M_3 en précisant le(s) rôle(s) joué(s) par chacun des ingrédients.

2. M_1, M_2 et M_3 sont des milieux synthétiques tandis que M_4 est un milieu empirique. Justifier cette affirmation.

3. *L. casei* ne cultive que sur le milieu M^4. Expliquer ce phénomène en mettant en évidence le(s) rôle(s) de l'extrait de levure.

4. Un *inoculum* de 10^6 cellules de *L. casei* est incubé dans le milieu M_4 au temps $t = 0$. On dénombre, au bout de 15 heures, alors que la phase exponentielle de croissance n'est pas achevée, une population de 64.10^6 cellules. Le temps de génération moyen est de 1 heure et 40 minutes.

4.1. Définir puis déterminer $N_{x\,expo}$.

4.2. Démontrer l'existence d'une phase de latence et donner sa durée.

4.3. Tracer sur papier millimétré la courbe Ln (nombre de cellules) = $f(t)$.

12. Étude de la croissance d'*E. coli* en milieu non renouvelé

La croissance d'*E. coli* en milieu non renouvelé est étudiée sur un milieu adéquat et dans des conditions favorables.

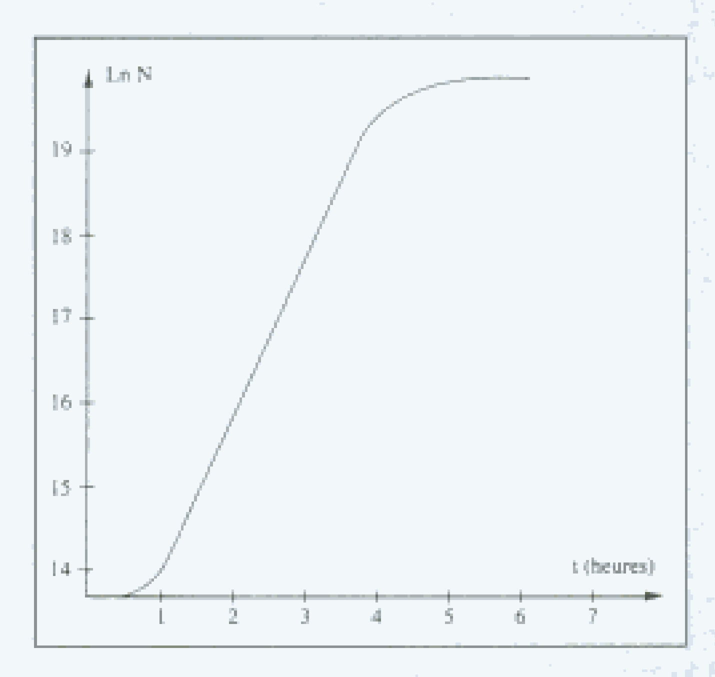
1. Le nombre de cellules par millilitre de milieu est obtenu après dilution de la suspension initiale et inoculation d'un milieu nutritif solide en boîte de Pétri.

On obtient :

Dilution	Volume inoculé (mL)	Nombre de colonies obtenues
10^{-5}	0,1	10^2

Calculer le nombre de bactéries par millilitre dans la suspension initiale.

2. Des mesures effectuées à des intervalles de temps réguliers ont permis de construire la courbe de croissance ci-jointe.



2.1. Nommer les différentes phases dans l'ordre chronologique et donner leur durée.

2.2. Expliquer comment varie la vitesse spécifique de croissance en fonction du temps pour les différentes phases. Tracer la courbe $\mu_x = f(t)$.

2.3. Des mesures effectuées aux temps t_1 et t_2 ont donné les résultats suivants :

t_1 = 2 heures	LnN_1 = 15,85
t_2 = 3 heures	LnN_2 = 17,95

Définir et calculer $N_{x\,expo}$. Justifier le choix des deux temps t_1 et t_2. En déduire le temps de génération (on prendra Ln_2 = 0,7).

13. Étude de la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*

À partir d'un lait cru, on a isolé une souche de L. bulgaricus.

1. Cette bactérie est ensemencée à une température de 45 °C et à pH 5,6 dans le milieu suivant :

Composants	Quantités
Glucose	1 g
K_2HPO_4	10,5 g
KH_2PO_4	3,5 g
NH_4Cl	0,5 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,05 g
$FeSO_4$, $7H_2O$	0,005 g
$CaCl_2$, $2H_2O$	0,05 g
$MnCl_2$, $4H_2O$	0,005 g
Eau distillée	1 litre

1.1. Comment qualifier ce milieu de culture ?

1.2. Aucune culture n'est alors visible. La culture apparaît lorsque l'on rajoute au milieu précédent de la riboflavine, sans changer les conditions physico-chimiques. Quel est le caractère de la bactérie ainsi mise en évidence ?

1.3. La culture en milieu additionné de riboflavine, mais à une température de 15 °C, est négative. Comment qualifie-t-on cette bactérie ?

2. On suit en parallèle l'évolution de la population bactérienne en bouillon MRS (Man-Rogosa-Sharpe) incubé à 45 °C et pH initial de 6,2, et l'acidification du milieu de culture par la méthode Dornic (acidité dosée par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine).

On obtient des résultats suivants :

t (minutes)	LnN	Acidité
0	16,35	20
15	16,35	20
30	16,55	20
45	17,05	21
60	17,50	23
75	17,95	27
90	18,55	30
105	19,00	35
120	19,55	40

t (minutes)	LnN	Acidité
135	20,00	50
150	20,50	60
165	20,70	70
180	20,70	75
195	20,50	78
210	20,25	80
225	20,00	82
240	19,80	82

2.1. Tracer sur le même graphique les courbes LnN = *f (t)* (échelle : 1 cm = 0,5 U Ln et 1 cm = 15 min) et acidité = *f(t)* (échelle ; 4 cm = 20 et 1 cm = 15 min).

2.2. Définir les paramètres de la croissance et les calculer.

2.3. Pourquoi y a-t-il acidification du milieu au cours de la croissance ?

2.4. Si on maintient artificiellement le pH du milieu de culture à une valeur de 6,2 (la température d'incubation étant de 45 °C), LnN reste constant et égal à 20,70 au-delà de 180 min. Pourquoi ?

Expliquer les différences observées au-delà de 180 min dans les deux expériences (2.1. et 2.4.).

14. Conditions de culture de croissance de *Listeria monocytogenes*

1. Culture.

Listeria monocytogenes est un germe peu exigeant. L'utilisation de milieux de culture synthétiques a permis de déterminer précisément ses exigences.

1.1. Indiquer la différence entre un milieu de culture empirique et un milieu de culture synthétique.

1.2. *Listeria monocytogenes* cultive facilement dans un milieu dont la composition est donnée ci-contre.

1.2.1. Citer les macroéléments fournis par ce milieu.

1.2.2. Indiquer la principale source de carbone de ce milieu. En déduire le type trophique de cette bactérie.

KH_2PO_4	6,60 g
Na_2HPO_4, $7H_2O$	31,00 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,40 g
Citrate ferrique	0,09 g
Glucose	10,00 g
Leucine	0,10 g
Isoleucine	0,10 g
Valine	0,10 g
Méthionine	0,10 g
Arginine	0,10 g
Cystéine	0,10 g
Glutamine	0,60 g
Riboflavine	0,50 mg
Thiamine	1,00 mg
Biotine	0,50 mg
Eau distillée	1,00 L

1.2.3. Souligner dans le tableau les substances pouvant être des facteurs de croissance. Comment appelle-t-on les micro-organismes qui nécessitent des facteurs de croissance ?

1.3. On observe que *Listeria monocytogenes* est capable de se développer à des températures proches de 0 °C bien que sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37 °C. Comment peut-on qualifier cette bactérie ?

Copyrighted material

CORRIGÉS

1. Compléter par

1. Phototrophes, photosynthétiques.

2. Syntrophie, facteur de croissance, satellitisme.

3. Aw, solvant, agent d'hydrolyse.

4. Temps de génération, temps séparant deux divisions cellulaires successives.

5. Asynchrone, escalier, synchrone.

6. UFC, unité formant colonie, unique.

7. Turbidimétrie, l'absorption, proportionnelle.

8. Phase exponentielle, temps de génération, taux de croissance, maximale.

9. Turbidostat, chémostat, taux de croissance.

10. Discontinue alimenté, *batch*, continue, soutire, réacteur.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : il désigne les micro-organismes exigeant la présence d'un ou de plusieurs facteurs de croissance pour leur développement. Le terme correct pour désigner ceux utilisant le CO_2 comme seule source de carbone est autotrophe.

2. Faux : cette substance n'est indispensable qu'à certains micro-organismes, les auxotrophes.

3. Vrai.

4. Faux : « vitesse spécifique de croissance » désigne la vitesse de croissance rapportée à l'unité de biomasse ; elle peut être déterminée tout au long de la croissance. Le « taux de croissance » désigne la valeur de cette vitesse spécifique pendant la phase exponentielle, période où elle est constante et maximale dans les conditions définies de culture ; c'est un paramètre caractéristique du micro-organisme.

5. Vrai.

6. Faux : « diauxie » désigne le phénomène par lequel les micro-organismes utilisent un substrat carboné puis l'autre après une phase d'adaptation (courbe de croissance en deux étapes).

7. Faux : il faut en même temps éliminer du milieu (avec sa biomasse) et rajouter un volume équivalent de milieu neuf afin d'assurer l'apport de nutriments nécessaires.

8. Vrai.

9. Faux : la congélation doit être réalisée avec une vitesse adaptée afin de ne pas détruire les structures et fonctions cellulaires. Par contre, afin d'assurer une remise en culture efficace, la décongélation doit être réalisée le plus rapidement possible.

10. Vrai.

3. Nutrition et croissance de *Yersinia pestis*

1.1. Chimio-organotrophe : substrat énergétique (donneur d'électron) d'origine organique. Hétérotrophe : se développe spécifiquement en milieu organique.

1.2. Exigence en facteur de croissance, bactérie auxotrophe.

2.1. et 2.2. Voir courbe fig. III-15a, chap. III, § 3.2.1 et 3.2.2. t_1 dans la phase a (latence), t_2 en phase c (exponentielle), t_3 en phase e (stationnaire) et t_4 en phase f (déclin).

4. Nutrition et dosage microbiologique chez *Bacillus subtilis*

1.1. Milieu minimum : sans molécules organiques autres que la source de carbone sous forme de glucose.

1.2. Hétérotrophe, *Bacillus subtilis* exige donc un milieu non minimum (donc le milieu 1 ne convient pas), avec substrat organique tel le milieu 2. Mais étant également auxotrophe pour le tryptophane, il l'exige comme apport nutritionnel et facteur de croissance. Cet acide aminé ne figurant pas dans la composition du milieu 2, celui-ci ne convient pas non plus tel quel. La condition pour que la culture ait lieu est de rajouter du tryptophane dans la composition du milieu 2.

1.3. Milieu 1 : pour bactéries chimiolithotrophes, autotrophes.

1.4. Chlorure d'ammonium : source d'azote, sulfate de magnésium : magnésium cofacteur enzymatique, source de soufre.

2.1. On utilise une souche pure auxotrophe pour le tryptophane. On réalise plusieurs essais de culture sur milieu avec ces concentrations croissantes en tryptophane. Toutes les cultures ont lieu à même température d'incubation et on mesure leur absorbance au bout du même temps t d'incubation. Le milieu de culture doit être dépourvu de tout précurseur métabolique du tryptophane.

2.2. Oui, car cette bactérie est auxotrophe pour le tryptophane.

2.3. Proportionnalité entre l'absorbance et la concentration en tryptophane. Par la suite, cette zone pourra être utilisée comme droite d'étalonnage pour déterminer la concentration inconnue d'une solution de tryptophane. Dans cette partie, le tryptophane peut-être qualifié de facteur limitant.

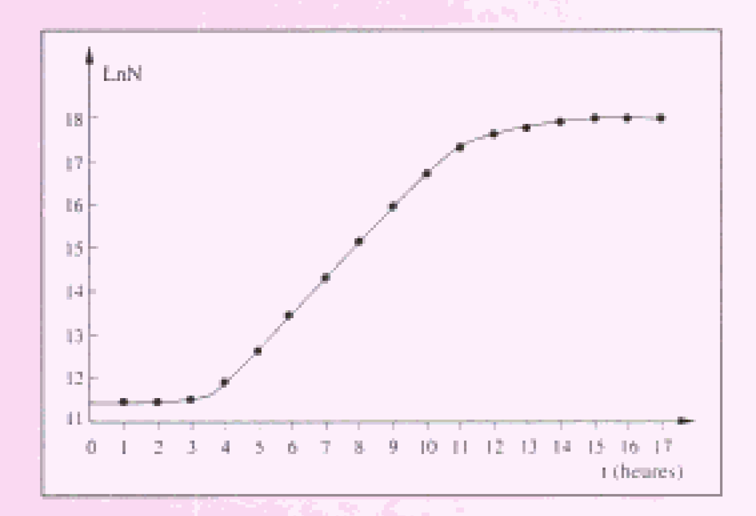
5. Étude de la croissance d'une souche d'*Acetobacter*

1. Numération en milieu solide par la méthode des dilutions (voir chap. III, § 3.1.1.4.).

2.1. Courbe LnN = $f(t)$ (voir ci-dessous). Le choix de LnN au lieu de N s'impose dans la mesure où l'on désire linéariser en courbe la phase exponentielle afin de l'interpréter et d'en tirer les paramètres caractérisant la croissance (taux de croissance et temps de génération).

Valeurs de LnN :

t (en heures)	LnN
0	11,50
1	11,50
2	11,50
3	11,50
4	11,85
5	12,45
6	13,25
7	14,10
8	14,90
9	15,75
10	16,55
11	17,05
12	17,40
13	17,55
14	17,65
15	17,70
16	17,75
17	17,75



2.2. Phase de latence de 0 à 3 heures Phase d'accélération de 3 à 5 heures Phase exponentielle de 5 à 10 heures. Phase de décélération de 10 à 16 heures. Phase stationnaire après 16 heures.

2.3. $Ln (N_{t+G}) = LnN_t + Ln2$, car G étant le temps de doublement de population $N_{t+G} = 2N_t$ et $Ln_2N_t = LnN_t + Ln2$.

2.4. Soit $LnN_t = 12{,}45$ à $t = 5$ h, $Ln_2N_t = 12{,}45 + Ln2$, soit $12{,}45 + 0{,}7 = 13{,}15$ d'abscisse temps 5 h 50 environ. Le temps de génération, G, est donc de 50 minutes.

2.5. Soit $LnN_1 = 12{,}45$ à $t_1 = 5$ h et $LnN_2 = 16{,}55$ à $t_2 = 10$ h, tous deux pris en phase exponentielle, $\mu_{x\ expo}$, s'exprime par la relation $(LnN_2\text{-}LnN_1)/(t_2\ t_1)$, soit $(16{,}55\ 12{,}45)/(10\ 5) = 0{,}82\ h^{-1}$.

2.6. $\mu_{x\ expo}$ est relié au temps de génération par la relation $G = Ln2/\mu_{x\ expo}$. Si on calcule, on trouve $0{,}7/0{,}82 = 0{,}85$ heure soit 50 minutes, ce qui confirme ce que l'on a trouvé graphiquement en 2.4.

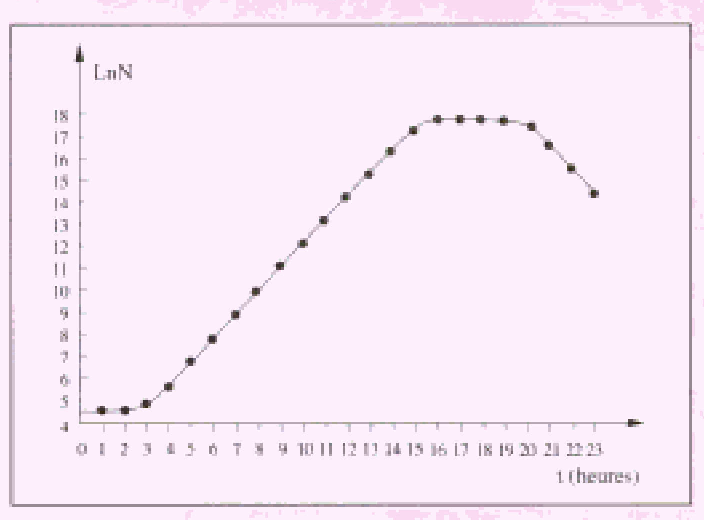
6. Croissance et métabolisme glucidique

1. En présence de glucose, la culture démarre directement en phase exponentielle sans phase de latence. Par contre, en présence de xylose, ce n'est qu'après une latence de 2 heures environ que la culture se trouve en phase exponentielle. Cependant, quels que soient les milieux, la phase exponentielle se déroule à la même vitesse (droites parallèles). La vitesse spécifique de croissance et le temps de génération sont les mêmes dans les deux cas.

2. Cette courbe présente trois phases. De 0 à 2 heures, LnN est proportionnel à *t*, puis de 3 à 5 heures, une phase stationnaire avant une reprise de croissance matérialisée par une pente identique à la première phase. D'après ce que l'on a appris dans la question 1, la première phase correspond à la croissance par utilisation du glucose uniquement puis, après adaptation au xylose, croissance par utilisation de ce sucre avec des paramètres identiques ; phénomène de diauxie (voir chap. III, § 3.2.4.)

7. Étude de la croissance en milieu liquide de *Salmonella anatum*

1.1. Courbe LnN = *f (t)* ci-dessous.



1.2. Phase 1, de 0 à 2 heures : phase de latence, biomasse constante, adaptation enzymatique au milieu. Phase 2, de 2 à 4 heures : phase d'accélération de la croissance, la vitesse de croissance augmente. Phase 3, de 4 à 15 heures : phase exponentielle, vitesse de croissance constante et maximale dans les conditions opératoires. Phase 4 de 15 à 16 heures : phase de décélération, la vitesse de croissance diminue, le milieu commence à s'épuiser. Phase 5, de 16 à 18 heures : phase stationnaire, la vitesse de croissance apparaît nulle, en fait autant de cellules apparaissent (division) qu'il n'en disparaît (lyse cellulaire), épuisement du milieu. Phase 6, après 18 heures : la biomasse diminue, épuisement du milieu et accumulation de déchets toxiques, autolyse cellulaire. Voir chap. III, § 3.2.2. et 3.2.3.

1.3. $\mu_{x\ expo}$. Soit les points N1 ($LnN_1 = 6{,}70$, $t_1 = 5$ h) et N2 ($LnN_2 = 14{,}95$, $t_2 = 13$ h) pris en phase exponentielle ; $\mu_{x\ expo} = (LnN_2\text{-}LnN_1)/(t_2 - t_1) = 1\ h^{-1}$. Temps de génération, G. Soit le point N ($LnN = 6{,}70$, $t = 5$ h) et 2N ($Ln2N = 6{,}70 + 0{,}7 = 7{,}40$ d'abscisse $t_2 = 5{,}7$), $G = t_2 - t = 0{,}7$ heure, soit 42 minutes.

2.1. Le milieu trypticase-soja, plus riche, va permettre une vitesse de croissance plus élevée. Donc $\mu_{x\ expo}$ augmente et G diminue.

2.2. Après certainement la même durée de phase de latence, la phase exponentielle présentera une pente plus accrue et on arrivera à un niveau de phase stationnaire plus élevé.

8. Besoins nutritionnels d'une bactérie

1. Milieu 1 : milieu minimum (éléments minéraux apportant les oligoéléments et éléments de base) + source de carbone organique (glucose). Milieu 2 : en plus hydrolysat de caséine apportant acides aminés, peptides comme source de carbone et d'azote organique. Milieu 3 : l'extrait de levure apporte acides aminés et vitamines.

2. Souche A : prototrophe vis-à-vis des minéraux et hétérotrophe vis-à-vis du glucose. Souche B : *idem* en plus auxotrophe vis-à-vis d'acides aminés. Souche C : même chose mais auxotrophe vis-à-vis des vitamines apportées par l'extrait de levure.

3.1. La bactérie doit être auxotrophe pour cette vitamine.

3.2. La bactérie est mise en présence de différentes concentrations de la vitamine et on détermine la biomasse obtenue en phase stationnaire de manière à construire la courbe Nf = *f* ([vitamine]). Voir chap. III, § 1.3.2.

3.3 Recherche des vitamines dans les produits alimentaires.

9. Analyse des types trophiques de souches bactériennes

1.1. C'est un milieu minimum, entièrement minéral, sur lequel ne peuvent cultiver que des espèces totalement prototrophes (voir chap. III, § 1.3.).

1.2. L'atmosphère enrichie en CO_2 apporterait l'élément carbone sous forme minérale. Ce type d'apport convient aux bactéries autotrophes, capables de se développer sur milieu inorganique. C'est le cas des bactéries photosynthétiques et de la plupart des chimiolithotrophes (voir chap. III, § 1.1.1.).

2.1. La souche I cultive sur milieu de type A + citrate trisodique qui lui apporte l'apport carboné d'origine organique. Cette souche est donc hétérotrophe vis-à-vis du carbone. Vis-à-vis des autres composés, tous minéraux, c'est une souche prototrophe et chimiotrophe (voir chap. III, § 1.1.1. et 1.2.).

2.2. La source d'azote est ici d'origine minérale (sel d'ammonium du milieu A) et organique (acides aminés du milieu C).

2.3. Parce que l'on apporterait, par les peptones, des éléments carbonés et vitaminiques qui masqueraient le fait que, pour se développer, la souche B ne nécessite que du citrate comme apport de carbone, le citrate de Simmons.

3.1. Dans le milieu C, le glucose apporte une source organique de carbone mais, surtout, une source énergétique d'origine organique.

3.2. Chimio-organotrophe et hétérotrophe (voir chap. III, § 1.1.1. et 1.1.2.).

3.3. Oligoéléments = éléments minéraux présents en très petite quantité. Apportent les minéraux nécessaires à l'équilibre chimio-osmotique de la cellule, à l'activité enzymatique (cofacteurs). Voir chap. III, § 1.2.

3.4. Le fer.

3.5. Les acides aminés (histidine, méthionine, tryptophane), vitamines (biotine, thiamine, pyridoxine, acide nicotinique, pantothénate de calcium).

3.6. Facteurs de croissance = molécules carbonées indispensables, nécessaires à la synthèse d'autres molécules et que la cellule ne sait pas forcément fabriquer à partir des éléments minéraux (voir chap. III, § 1.3.).

4.1. Auxanogramme (voir chap. IV, § 8.2.1.).

4.2. Levures du genre *Candida*.

5.1. Staphylocoques : $(10^6 \times 1)/5 = 2.10^5$ bactéries par millilitre. Souche II : $(10^2 \times 1)/5 = 20$ bactéries par millilitre.

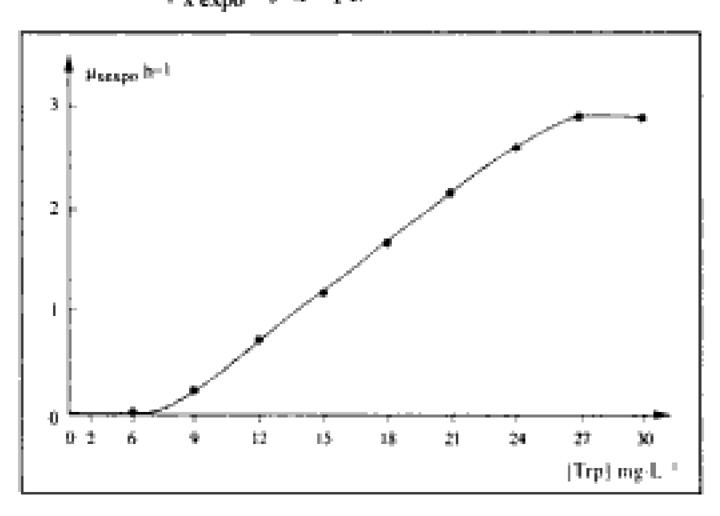
5.2. Pour le staphylocoque en 6 heures, soit 360 minutes, on passe de Ln (2.10^5), soit 12,2, à Ln (8.10^8), soit 20,5 ; soit une progression de LnN de 8,3. Le doublement de population correspond à 12,2 + Ln2, soit une progression de 0,7. Temps de génération = $(360 \times 0{,}7)/8{,}3$ = environ 30 minutes. Pour la souche II, on passe de Ln (20), soit 3, à Ln (3.10^3), soit 8. Le temps de génération est égal à $(360 \times 0{,}7)/(8 - 5) = 84$ minutes.

5.3. La souche II ne devrait théoriquement pas se développer sur le milieu B (voir tableau des résultats expérimentaux). Elle le fait pourtant, mais très lentement. Elle bénéficie en fait d'un apport nutritionnel synthétisé par le staphylocoque.

5.4. Phénomène de syntrophie se manifestant sur milieu gélosé par l'apparition d'un « satellitisme » des colonies de la souche II autour de colonies de staphylocoque (voir chap. III, § 1.3.3.).

10. Étude de la croissance de *Salmonella typhi murium* en fonction du tryptophane

1. Courbe $\mu_{x\ expo} = f$ ([Trp]) ci-contre.



2. On constate que la croissance ne démarre qu'à partir d'une concentration minimale de 6 mg . L^{-1}. Puis, après une phase d'augmentation exponentielle du taux de croissance entre 6 et 9 mg . L^{-1}, celui-ci augmente proportionnellement à la concentration en tryptophane pour atteindre, à partir de 27 mg . L^{-1}, une valeur maximale. Le tryptophane est donc indispensable à la croissance de *S. typhi murium*.

Copyrighted material

3. Le tryptophane est un facteur de croissance pour cette bactérie. D'autres acides aminés peuvent l'être pour d'autres bactéries ainsi que des vitamines, bases puriques ou pyrimidiques (voir chap. III, § 1.3.).

4. *S. typhi murium* est auxotrophe pour le tryptophane. Cette bactérie ne sait pas le synthétiser, il doit être apporté par le milieu (milieu complémenté). Voir chap. III, § 1.3.

5. Taux de croissance = vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle, constante et maximale dans les conditions opératoires considérées. Il s'exprime par la relation $\mu_{x\ expo} = (LnN_2 - LnN_1)/(t_2 - t_1)$, N_1 et N_2 étant pris en phase exponentielle. Ici : Ln $(6{,}31.10^6)$ = 15,65, Ln $(8{,}47.10^7)$ = 18,25, donc $\mu_{x\ expo} = (18{,}25 - 15{,}65)/(8 - 6) = 1{,}3\ h^{-1}$.

Temps de génération = temps nécessaire au doublement de la population. Il s'exprime par la relation $G = Ln2/\mu_{x\ expo}$, soit ici environ 0,5 heure. Voir chap. III, § 3.2.1. et 3.2.2.

11. Nutrition et croissance des lactobacilles

1. Milieu M_1 : milieu minimum (minéraux, apport d'oligoéléments et source de S, P, K, etc.) + NH_4Cl (apport d'azote sous forme de sel d'ammonium). Milieu M_2 : *idem* + glucose (apport de carbone organique et source d'énergie). Milieu M_3 : *idem* + acide folique et pyridoxal (facteurs de croissance précurseurs de coenzymes nécessaires au métabolisme). Voir chap. III, § 1.

2. M_4 contient de l'extrait de levure, apportant acides aminés, peptides, vitamines, mais dont on ne connaît pas la composition exacte.

3. *Lactobacillus* doit être auxotrophe (voir chap. III, § 1.3.) pour nombre d'acides aminés et vitamines qui ne sont apportés que par l'extrait de levure. Les acides aminés sont nécessaires à la synthèse des protéines, les vitamines servent de précurseurs à la synthèse de coenzymes.

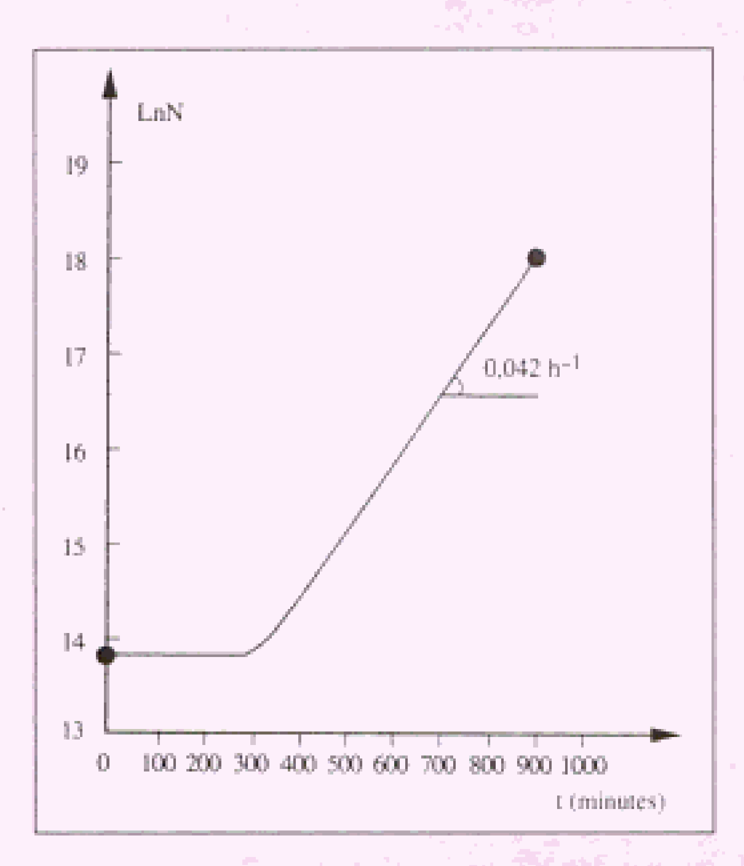
4.1. Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle, constante et maximale dans les conditions opératoires considérées (voir chap. III, § 3.2.1.). N'ayant pas de données sur l'existence ou non d'une phase de latence, il faut déterminer le taux de croissance à partir de la valeur donnée du temps de génération en appliquant la relation $G = Ln2/\mu_{x\ expo}$, donc $\mu_{x\ expo} = 0{,}7/100 = 0{,}007\ min^{-1}$ soit $0{,}42\ h^{-1}$.

4.2. Si l'on considère qu'il n'y a pas de phase de latence, compte tenu de la valeur du temps de génération, il y aurait donc Ln (64.10^6) – Ln (10^6) = 17,95 – 13,80 = 4,15 de progression de LnN, soit l'équivalent de 4,15/0,7 = 6 doublements de population (doublement = Ln2N = Ln + Ln2), ce qui nécessiterait une durée de 6 × 100 min = 600 minutes, or cette progression demande 15 heures, soit 900 minutes. Il existe donc une phase de latence de 300 minutes.

4.3. Courbe LnN = *f (t)* ci-contre, colonne de droite.

12. Étude de la croissance d'*E. coli* en milieu non renouvelé

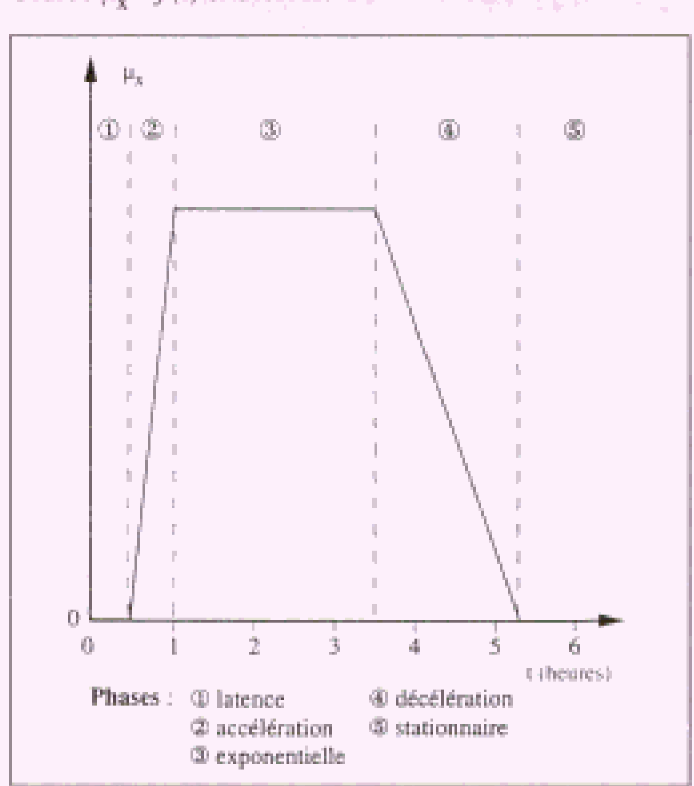
1. Nombre de bactéries initiales par mL : $(10^2 \times 10^5)/0{,}1 = 10^8$.



2.1. Courbe 1 : LnN = *f (t)*. Phase de latence de 0 à 30 minutes Phase d'accélération de 30 minutes à 1 heure. Phase exponentielle de 1 heure à 3 heures 30. Phase de décélération de 3 heures 30 à 5 heures 15. Phase stationnaire au bout de 5 heures 15.

2.2. En phase de latence, la biomasse n'évolue pas, la vitesse spécifique de croissance est nulle. En phase exponentielle, croissance optimale, elle est constante et maximale dans les conditions de l'expérience. En phase stationnaire, la biomasse n'évoluant plus, la vitesse redevient nulle.

Courbe $\mu_x = f(t)$ ci-dessous.



2.3. Taux de croissance = vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle, constante et maximale dans les conditions opératoires considérées (voir chap. III, § 3.2.1.). LnN_1 et LnN_2 sont pris aux temps 2 et 3 heures, donc bien pendant la phase exponentielle. Le taux de croissance, $\mu_{x\ expo}$, s'exprime par la relation : $(LnN2 - LnN1)/(t_2 - t_1)$, soit $(17{,}95 - 15{,}85)/(3 - 2) = 2{,}1\ h^{-1}$. Le temps de génération se déduit du taux de croissance par la relation : $Ln2/\mu_{x\ expo}$ soit ici $0{,}7/2{,}1 = 0{,}33$ heure, soit 20 minutes.

13. Étude de la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*

1.1. Milieu minimum (voir chap. III, § 1.3.).

1.2. Auxotrophie vis-à-vis de la riboflavine. La bactérie ne sait pas la synthétiser, or elle en a absolument besoin, c'est un facteur de croissance qu'il faut introduire dans le milieu de culture (voir chap. III, § 1.3.).

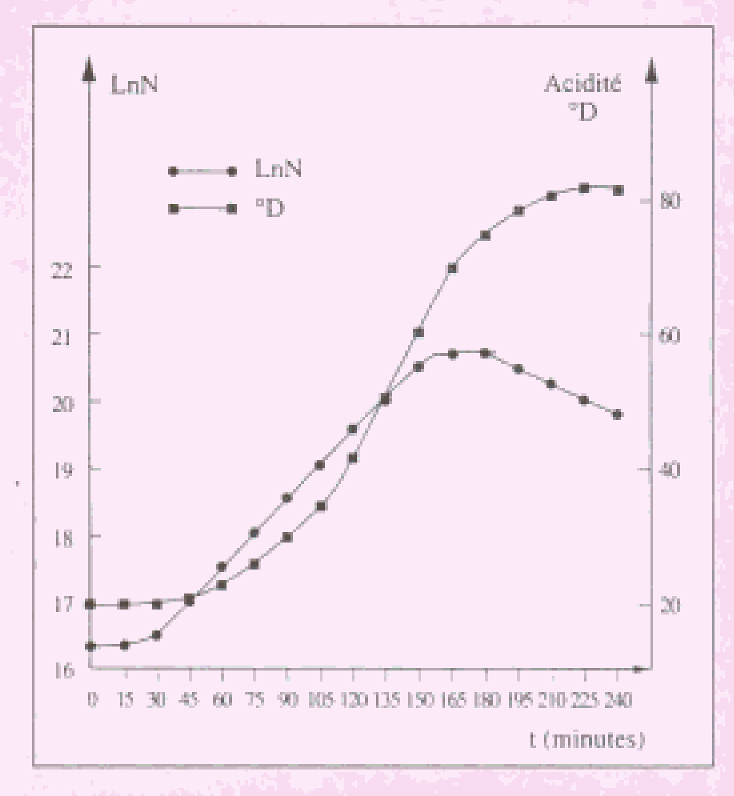
1.3. Bactérie mésophile (voir chap. III, § 1.4.1.).

2.1. Courbes LnN = *f(t)* et acidité = *f(t)* ci-contre.

2.2. Temps de génération = temps nécessaire au doublement de la population (voir chap. III, § 3.2.2.). Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle, constante et maximale dans les conditions opératoires considérées (voir chap. III, § 3.2.1.). Vitesse spécifique : soit $LnN_1 = 17{,}05$ à $t_1 = 45$ min et $LnN_2 = 20{,}00$ à $t_2 = 135$ min pris tous les deux en phase exponentielle, le taux de croissance, $\mu_{x\ expo}$, est donné par la relation $(LnN_2 - LnN_1)/(t_2 - t_1)$ soit $(20{,}00 - 17{,}05)/(135 - 45) = 0{,}03\ min^{-1}$. Le temps de génération, G, est donné par la relation $Ln2/\mu_{x\ expo}$, soit $0{,}7/0{,}03 = 23$ minutes environ.

2.3. *Lactobacillus*, à partir du glucose, réalise un métabolisme producteur d'acide lactique (fermentation lactique, voir chap. IV, § 4.1.1.3.).

2.4. En maintenant le pH artificiellement à 6,2, on évite la lyse cellulaire due à l'acidité excessive et, donc, on reste plus longtemps en phase stationnaire. Par contre, si on laisse évoluer le pH, l'excès d'acide est toxique pour la bactérie qui est rapidement détruite (phase de déclin).



14. Conditions de culture de croissance de *Listeria monocytogenes*

1.1. Milieu empirique, ou naturel : de composition mal définie, uniquement à base de substances naturelles (extrait de viande, peptones) de sel et d'eau. Milieu synthétique : chimiquement défini, de composition qualitative et quantitative connue.

1.2.1. Macroéléments : KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $7H_2O$, $MgSO_4{,}7H_2O$

1.2.2. Le glucose. Bactérie chimio-organotrophe et hétérotrophe.

1.2.3. Riboflavine, thiamine, biotine. Bactéries auxotrophes.

1.3. Bactérie psychrotrophe.

Chapitre 4

Métabolisme

1. Introduction

Le métabolisme d'une cellule ou d'un organisme est constitué par la somme totale des réactions chimiques qui se produisent à son niveau. Celles-ci interviennent dans le sens de la dégradation ou de la synthèse. D'une part, la bactérie transforme les aliments qu'elle reçoit en molécules organiques simples, en métabolites intermédiaires. D'autre part, elle réunit ces métabolites, constituants élémentaires, en substances complexes de poids moléculaire élevé, les macromolécules. Cette biosynthèse cellulaire nécessite à la fois des matériaux organiques simples et l'énergie assurant leur union.

Notre but n'est pas de faire ici une étude détaillée du catabolisme (dégradation) et de l'anabolisme (synthèse) des différentes substances énergétiques utilisées par les micro-organismes ; nous nous en tiendrons à la description de quelques aspects du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides en insistant sur les implications pratiques (au niveau du laboratoire et de l'industrie).

1.1. Aspect énergétique

Les besoins énergétiques de la bactérie peuvent être satisfaits par deux mécanismes :

– la **photosynthèse**, au cours de laquelle la lumière est utilisée comme source d'énergie ;

– l'**oxydation** de substances chimiques, encore appelées substrats énergétiques. D'un autre point de vue, on peut considérer les réactions chimiques non pas sous le seul aspect énergétique mais sous l'angle des substances soumises à la dégradation et des produits de cette dégradation. Les substrats de ces réactions proviennent soit des aliments fournis, soit du métabolisme énergétique. La somme globale de ces réactions constitue le **catabolisme**. À l'opposé, on parle d'**anabolisme** pour désigner les opérations de biosynthèse grâce auxquelles des éléments organiques simples fournis aux cellules ou résultant des dégradations cataboliques sont réunis en constituants macromoléculaires. Cette synthèse utilise l'énergie fournie par les rayons lumineux ou par l'oxydation chimique *(fig. IV.1)*. On donne aussi le nom **de métabolisme intermédiaire** à l'ensemble des réactions qui convertissent les nutriments en métabolites nécessaires aux biosynthèses.

Les modifications qui apparaissent dans la cellule vivante ne peuvent être assimilées à de pures réactions chimiques. Deux propriétés leur sont propres. D'une part, elles sont toujours **exergoniques**, c'est-à-dire qu'elles libèrent de l'énergie, elles ne peuvent supporter une température élevée, incompatible avec la vie cellulaire. D'autre part, elles nécessitent l'intervention de catalyseurs pour remédier à l'absence de source d'énergie d'activation. Ceux-ci favorisent le déclenchement et le déroulement de la réaction. On les appelle des **enzymes**.

Copyrighted material

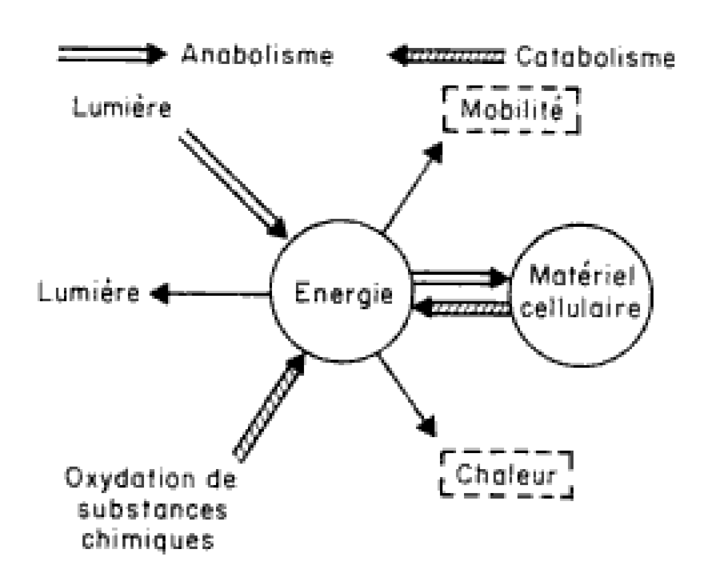


Figure IV.1 – **Le métabolisme énergétique chez la bactérie.**

1.2. Transport des substances

Pour être assimilé, le substrat doit se trouver au contact d'enzymes capables de le transformer, de l'oxyder au cours d'une ou de plusieurs étapes. Dans la cellule bactérienne, ces enzymes sont diversement situées. Les unes, celles de la chaîne respiratoire, sont localisées au niveau de la membrane cytoplasmique : ce sont toutes les déshydrogénases (formique, lactique, succinique, etc.), les cytochromes, les flavoprotéines, la cytochrome oxydase. Les autres, c'est-à-dire la plupart de celles qui gouvernent les cycles métaboliques, sont solubles et se retrouvent libres dans le cytoplasme. Par exemple, toutes les réactions du métabolisme des glucides sont effectuées dans le cytoplasme.

1.2.1. Digestion

Les aliments fournis à la bactérie ne peuvent être assimilés que s'ils pénètrent au niveau du cytoplasme après avoir traversé la paroi et la membrane cytoplasmiques. La plupart sont de poids moléculaire élevé et de trop grande taille pour y parvenir. Ils doivent être préalablement brisés en fragments de faible poids moléculaire. Ce travail de « digestion » est accompli par des enzymes hydrolytiques, excrétées par la bactérie dans le milieu. On les appelle des **exoenzymes** par opposition à celles qui restent prisonnières à l'intérieur de la cellule, ou **endoenzymes**. Les produits qui prennent naissance sont de courts fragments peptiques ou des acides aminés lorsque le substrat est protéinique, des oses et des holosides simples lorsqu'il est polyholosidique, des acides gras et du glycérol avec une substance lipidique, des nucléosides et du phosphate inorganique avec les acides nucléiques.

1.2.2. Pénétration

Les modes de pénétration (voir chap. II) peuvent varier selon les composés. On en distingue deux principaux.

• **Diffusion passive**. Elle suit les lois de la diffusion physique des molécules (loi de Fick) et ne nécessite aucune dépense d'énergie de la part de la cellule. Le flux moléculaire s'oriente des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées pour tendre finalement vers un état d'équilibre.

• **Pénétration active** (ou transport actif). Elle est indépendante du gradient de concentration. Le substrat se concentre à grande vitesse dans le cytoplasme (jusqu'à 100 fois) grâce à des enzymes spéciales qu'on appelle les **perméases**. Une perméase est spécifique d'un substrat (par exemple, perméase du lactose ou du maltose) et d'un sens de travail ; pour les nutriments, ce travail s'exerce le plus souvent de l'extérieur vers l'intérieur, mais il peut y avoir des sécrétions provenant de substances endocellulaires. Selon l'origine de l'énergie qui est nécessaire pour vaincre le gradient de concentration, on distingue :

– le transport actif primaire, ou **uniport** ;

– le transport actif secondaire, ou **cotransport**. Par rapport au gradient vecteur, le cotransport peut se faire :

- dans le même sens, c'est le **symport** (par exemple, H^+ et lactose, H^+ et proline),

- en sens opposé, c'est l'**antiport** (par exemple, $2H^+$ et Ca^{++}, H^+ et Na^+) ;

– le transport par translocation de groupe.

1.3. Biosynthèse

La cellule bactérienne, dans ses structures essentielles comme la capsule, la paroi, la membrane et l'appareil nucléaire, est constituée de milliers de

Copyrighted material

composés organiques complexes de poids moléculaire élevé, appelés **macromolécules**, qui doivent être synthétisées. Ce métabolisme donne naissance, au cours de multiples étapes, à des produits qui sont « récupérés » directement ou qui sont à la base de nouvelles réactions intermédiaires, destinées à fournir les éléments constitutifs des macromolécules bactériennes : c'est le **métabolisme primaire**. Les réactions de ce métabolisme intermédiaire sont si nombreuses et si complexes qu'elles ne peuvent être décrites dans le cadre de ce livre. Quelques exemples seulement seront choisis à titre d'illustration.

Les macromolécules ont toutes un type de structure identique : ce sont des polymères, c'est-à-dire de longues chaînes moléculaires formées de sous-unités, ou monomères, assemblées entre elles par des liaisons spécifiques. Lorsque les sous-unités sont identiques, on a affaire à un polymère simple ou **homopolymère**. Si, en revanche, elles sont différentes, on parle d'**hétéropolymère**. L'arrangement des monomères peut être strictement linéaire ou éventuellement ramifié. Il peut aussi se reproduire régulièrement ou irrégulièrement. Suivant ces possibilités, on peut reconnaître classiquement :

– les polysaccharides soit homopolymères A-A-A-A-A- (par exemple, amidon, cellulose), soit hétéropolymères réguliers A-B-A-B-A (par exemple, muréine) ;

– les acides nucléiques comprenant quatre types de bases puriques ou pyrimidiques dont la séquence est totalement irrégulière, hétéropolymères irréguliers : A-T-G-G-T-G-C-A ;

– les protéines formées de l'assemblage de 20 types d'acides aminés, hétéropolymères irréguliers : A-B-L-C-D-D-E-F. La polymérisation exige une certaine quantité d'énergie, mise en réserve au niveau des monomères préalablement activés.

À côté de ce métabolisme primaire, de nombreux métabolites secondaires sont produits. Ces composés ont pour caractéristiques :

– une grande variété de structures et d'activités biologiques ;

– de ne pas être indispensables à la croissance ;

– de dériver du métabolisme primaire par des voies de synthèse particulières ;

– une production à des moments particuliers de la vie (en général durant la phase stationnaire) ;

– un produit donné qui est synthétisé par un nombre réduit d'organismes.

On connaît actuellement plus de 1 000 produits différents chez les bactéries, près de 2 000 chez les champignons et environ 5 500 chez les actinomycètes (voir § 8.2.3.).

L'étude du métabolisme nécessite que soient précisées de façon très brève les notions d'enzymes et de réactions enzymatiques. Elle doit envisager, entre autres, les aspects énergétiques des phénomènes, les processus de dégradation des substrats et de biosynthèse du matériel cellulaire, enfin les mécanismes de régulation.

2. Enzymes bactériennes

2.1. Localisation

Les enzymes bactériennes se trouvent soit sous forme liée à la membrane cytoplasmique (ou séquestrée dans l'espace périplasmique des bacilles à Gram négatif), soit sous forme libre dans le cytoplasme ou dans le milieu externe. Les enzymes liées sont essentiellement celles qui participent à la respiration cellulaire et aux échanges. Parmi elles, on trouve :

– des enzymes **exocellulaires** ou **exoenzymes** (sécrétées dans le milieu externe). Dans cette catégorie figurent des enzymes permettant la dégradation de macromolécules (amylase, caséinase) mais aussi des enzymes responsables du pouvoir pathogène (coagulase, ADNase, exotoxines, etc.) ;

– des enzymes **endocellulaires** (ou **endoenzymes**). En solution dans le cytoplasme, elles participent au métabolisme intermédiaire de la cellule (β-galactosidase, enzymes de la glycolyse, etc.).

2.2. Classification

Les enzymes sont réparties en 6 classes en fonction du type de réaction catalysée. Chaque classe est elle-même subdivisée en fonction de la nature du groupement chimique donneur, de la nature de l'accepteur et de la nature du substrat.

• **Oxydoréductases**. Elles assurent le transfert d'électrons (avec ou sans transfert de protons) à partir d'un substrat vers

Copyrighted material

un accepteur terminal : lacticodéshydrogénase, lysine désaminase (LDA), cytochrome oxydase, nitrate réductase, etc.

• **Transférases**. Elles facilitent le transfert de certains radicaux ($-CH_3$, -CHO, -SH, $-NH_2$). Les transaminases et les kinases (pyruvate kinase) en sont des exemples.

• **Hydrolases.** Elles catalysent l'introduction d'une molécule d'eau sur un substrat selon la réaction

$$A\text{-}B + HOH \rightarrow AH + BOH.$$

Elles sont très courantes au cours des réactions cataboliques : estérase, lipase, peptidase, ADNase, cellulase, uréase, etc.

• **Lyases**. Elles assurent le déplacement d'un radical à partir d'un substrat : lysine ou ornithine décarboxylase, aldolase, cétolase, etc.

• **Isomérases**. Elles catalysent certains réarrangements intramoléculaires : épimérase, énolase, racémase, etc. Telles sont la DL-alanine racémase, la phosphohexo-isomérase (glucose-P → fructose-P).

• **Ligases** ou **synthétases**. Au cours des réactions anaboliques, elles catalysent l'établissement de liaisons covalentes. Par exemple, liaisons C-C par les carboxylases.

3. Métabolisme énergétique

3.1. Différentes sources d'énergie

L'énergie constitue la plaque tournante du métabolisme cellulaire. Les réactions qui fournissent cette énergie sont donc vitales pour la cellule. Selon la nature de la source primaire d'énergie, deux voies principales s'offrent aux micro-organismes : la **phototrophie** et la **chimiotrophie**. Dans les deux cas, la récupération de l'énergie est liée à un transfert d'électrons par des **chaînes de transport électronique transmembranaire** *(fig. IV.2)* permettant ainsi la création d'un **gradient électrochimique de protons** de part et d'autre de la membrane cytoplasmique ; ce gradient est lui-même à l'origine d'une **force proton-motrice** (véritable courant électrique) pouvant être utilisée à diverses fins : transport actif, production de molécules riches en énergie, mobilité, etc.

Le monde microbien présente une grande diversité dans les sources d'énergies utilisables. Certains micro-organismes aérobies ressemblent aux cellules animales et synthétisent leur ATP à partir de sucres dégradés *via* la glycolyse et le cycle de Krebs par une chaîne respiratoire membranaire très semblable à celle des mitochondries. D'autres, anaérobies, tirent leur énergie de la fermentation des sucres ou d'une chaîne de transport d'électrons qui utilise un composé autre que l'O_2 comme accepteur final d'électrons ; là encore, la chaîne des transporteurs, localisée dans la membrane cytoplasmique, est comparable à celle des mitochondries. Les phototrophes, quant à eux, captent l'énergie lumineuse.

Du point de vue du fonctionnement énergétique, les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries présentent des analogies fondamentales. Toutes les bactéries présentent en particulier dans leur membrane une **ATP synthétase** analogue à celle des mitochondries et des chloroplastes ; ce com-

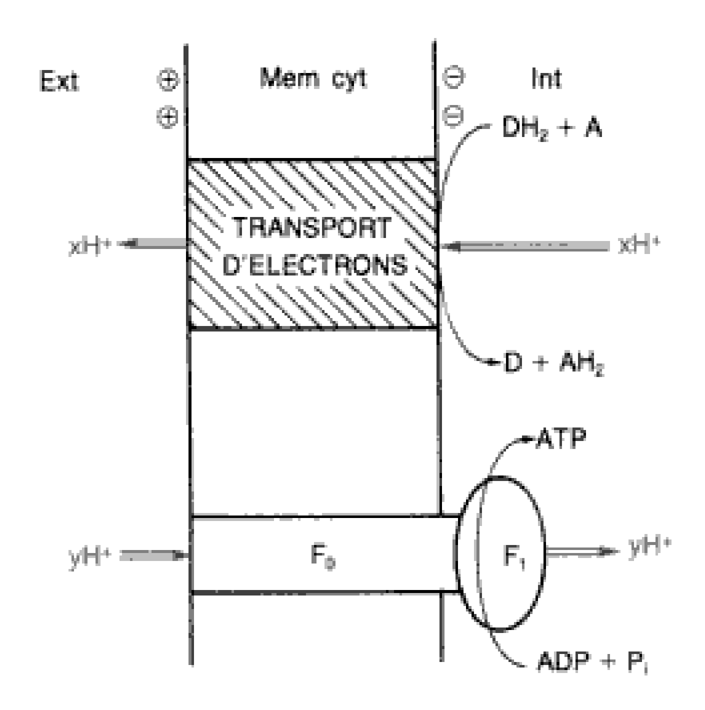


Figure IV.2 – **Schéma du transport d'électrons et de protons à travers la membrane cytoplasmique (Mem cyt) et de la phosphorylation liée à la force protonmotrice (théorie de Mitchell). D et A respectivement donneur et accepteur, y vaut dans la plupart des cas 2 ou 3, x vaut 1 ou 2.**

Copyrighted material

plexe protéique transmembranaire assure la conversion du flux de protons en énergie de liaison phosphate au niveau de l'ATP, réalisant ainsi un couplage entre les réactions productrices de protons et le stockage de cette énergie sous une forme utilisable par la cellule.

3.1.1. Organismes phototrophes et photosynthèse

Les modalités diffèrent selon qu'il s'agit de végétaux *(fig. IV.3a)* ou de bactéries. D'une part, la structure des appareils photosynthétiques, de même que celle des pigments photosynthétiques sont distinctes (chap. II) et, d'autre part, les donneurs d'électrons le sont également : avec les plantes, il s'agit d'H_2O (avec libération d'O_2) ; avec les bactéries, il s'agit d'un composé autre, tel que l'H_2S ou un constituant organique ; le processus ne libère jamais d'oxygène libre.

La photosynthèse bactérienne s'exerce selon trois mécanismes principaux dont les deux premiers présentent de grandes analogies avec la photosynthèse des plantes vertes :

– les bactéries utilisatrices de dérivés soufrés, comme les sulfobactéries vertes qui utilisent l'énergie lumineuse pour transférer des atomes d'hydrogène de l'H_2S au $NADP^+$, réalisent ainsi un saut de potentiel d'environ 200 mV (contre 1 140 mV chez les chloroplastes utilisant l'eau comme donneur) avec une accumulation de soufre *(fig. IV.3b)* ;

– les bactéries qui n'utilisent pas de dérivés soufrés créent un flux électronique cyclique et font intervenir des transporteurs électroniques membranaires du type de ceux de la chaîne respiratoire (ubiquinone, cytochrome b, c, c_2). Ces transporteurs, qui recyclent les électrons de la **bactériochlorophylle** tout en assurant un pompage de protons, seront à l'origine d'une synthèse d'ATP *(fig. IV.3c)* ;

– une autre façon de récupérer l'énergie lumineuse a été découverte chez *Halobacterium halobium* (bactérie vivant dans les milieux salés) qui possède, dans sa membrane cytoplasmique, de la **bactériorhodopsine** (un pigment voisin des pigments de la rétine de l'œil). Cette molécule capte les photons par le groupe rétinal et utilise l'énergie ainsi captée pour un pompage de protons au travers de la membrane cytoplasmique, créant là aussi un gradient électrochimique important qui est à l'origine d'une synthèse d'ATP *(fig. IV.3d)*.

– Dans tous les cas et contrairement aux végétaux, il n'y a pas de photolyse de l'eau et donc de libération d'O_2 ; chez les cyanobactéries (ou algues bleu-vert), seule la photosynthèse est analogue à celle des chloroplastes. La *fig. IV.3* résume les différents modes de récupération de l'énergie lumineuse ; le résultat final est la production d'ATP aux dépens d'ADP.

3.1.2. Organismes chimiotrophes et oxydations biologiques

La plupart des micro-organismes sont dépourvus d'appareil et de pigments photosynthétiques. Ils doivent, pour leur synthèse, utiliser l'énergie libérée au cours de réactions chimiques. Le métabolisme général comporte trois étapes :

– digestion des macromolécules et des grosses molécules à l'extérieur de la cellule ;

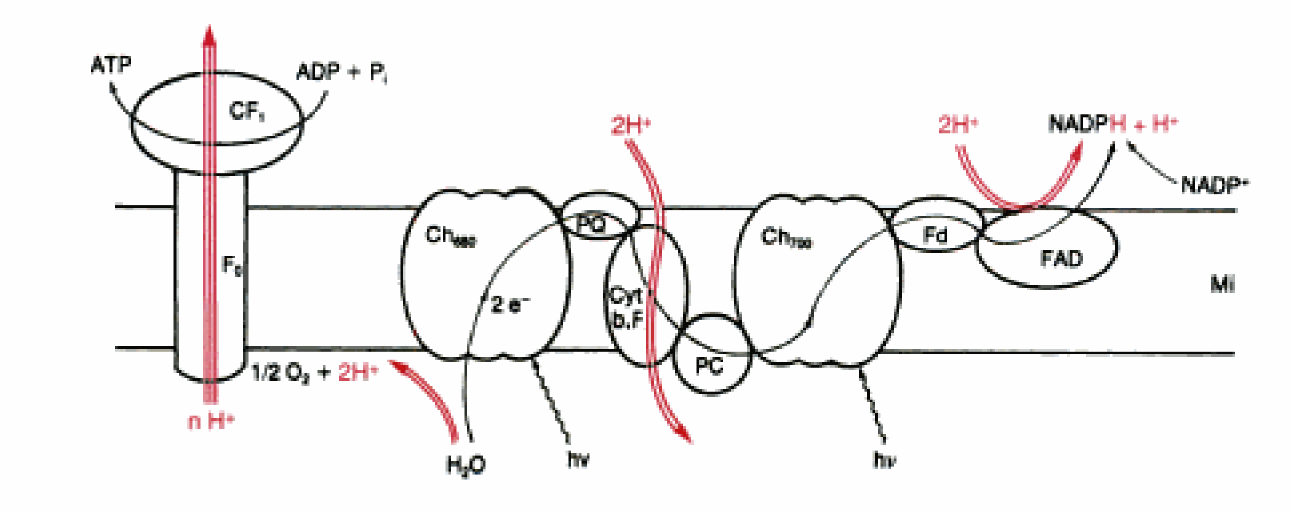
– dégradation des petites molécules pour donner des métabolites intermédiaires (pyruvate, acétyl CoA) et de l'énergie (ATP) ;

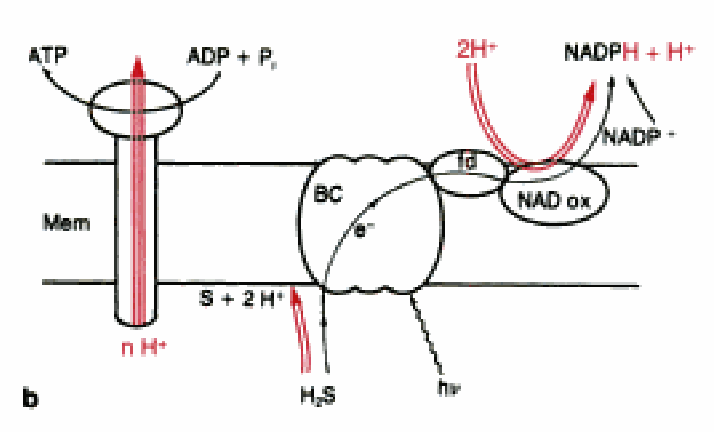
– dégradation totale des métabolites intermédiaires en CO_2 et H_2O avec une grande production d'énergie (ATP).

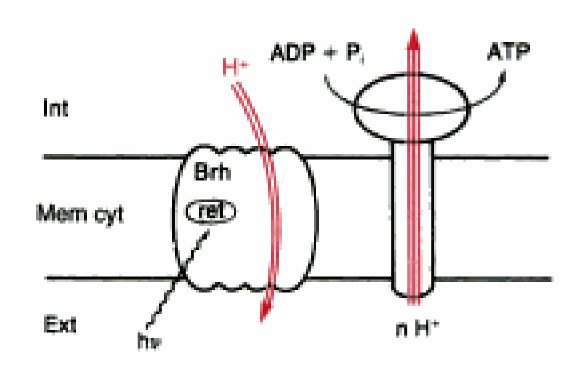
Ce sont toujours des réactions d'oxydation de substances organiques ou inorganiques. L'oxydation d'un substrat A peut être définie comme le processus au cours duquel le substrat perd ses électrons. Le substrat A est appelé donneur d'électrons ; il donne naissance à un produit oxydé. Corrélativement, un autre composant B, appelé accepteur d'électrons, donne naissance à un produit réduit.

Dans la plupart des cas, le produit A est un composant organique, par définition hydrogéné. Dans ces conditions, l'oxydation est en réalité une déshydrogénation, tandis que la réduction est une hydrogénation. Le phénomène dans son ensemble est connu sous le nom d'oxydoréduction. On peut le transcrire de la façon suivante :

Copyrighted material







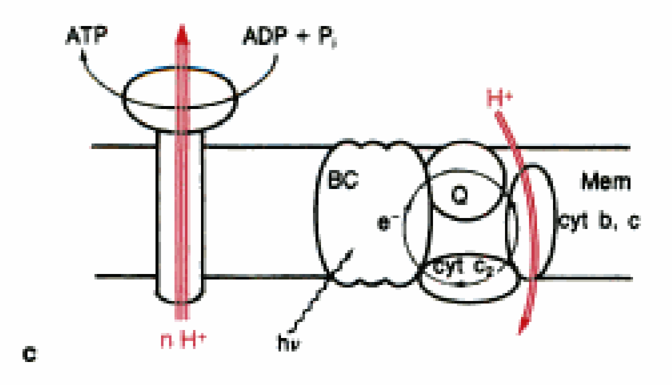


Figure IV.3 – Les différents types de photosynthèse.

a : Non cyclique chez les chloroplastes
Les électrons issus de l'eau sont, grâce à l'énergie lumineuse captés par la chlorophylle 680, transmis par une chaîne de transporteurs (PQ, cyt, PC) à la 2ᵉ chlorophylle (ch700) pour être transférés grâce à une nouvelle quantité d'énergie lumineuse *via* la ferredoxine et le FAD au NADP formant ainsi un principe réducteur très puissant ; les protons libérés à l'intérieur de la membrane interne (Mi) (4 par cycle) retournent à l'intérieur du chloroplaste *via* l'ATPase (F_0-CF_1) en formant un ATP pour 3 H^+ transférés.
b : Chez les bactéries utilisant des dérivés soufrés (ex. : sulfobactéries) ; dans le cas de figure le soufre s'accumule à l'extérieur de a cellule, il existe aussi des bactéries qui accumulent le soufre dans le cytoplasme, les réactions se déroulent alors au niveau des chromatophores.

lc : Cyclique chez les bactéries vertes non soufrées. L'électron de la bactériochlorophylle excité par le photon effectue un cycle qui le ramène à la chlorophylle tout en assurant le transfert de proton.
d : Chez *Halobacterium halobium*.
Il n'y a pas de chaîne de transporteur, le transfert de protons est directement assuré par le pigment.
Mem cyt : membrane cytoplasmique
Mem : membrane
Int : intérieur
Ext : extérieur
bc : bactériochlorophylle
brh : bactérorhodopsine
Ch700, Ch680 : chlorophylles
fd : ferredoxine
cyt : cytochrome
Q : coenzyme Q
NADox : NAD oxydase
PQ : plastoquinone
PC : plastocyanine
hν : photons
ret : groupe rétinal qui capte les photons
F_1-F_0 ou CF_1-F_0 : ATPase entraîné par le flux de protons
→ flux d'électrons
⇒ flux de 2 protons
⇛ flux de n protons (3 en général)

Copyrighted material

Oxydation :

AH_2 (donneur d'hydrogène)
$-2H^+ \downarrow -2e^-$
A (produit oxydé) + énergie

Réduction :

B (accepteur d'hydrogène)
$+2H^+ \downarrow +2e^-$
BH_2 (produit réduit)

Somme :

$$AH_2 + B \Leftrightarrow A + BH_2 + \text{énergie}.$$

Au cours de ces réactions, le transfert de l'hydrogène ou des électrons du substrat sur l'accepteur est réalisé par toute une série d'enzymes ou déshydrogénases qui forment une **chaîne de transport électronique** ; ce sont les coenzymes associées aux déshydrogénases qui jouent le rôle d'intermédiaires.

L'ensemble de ces réactions si merveilleusement réglées montre que :

– l'**oxydation** du substrat AH_2 est assurée parallèlement à la **réduction** du produit B ;

– tous les **catalyseurs** introduits dans le système sont **régénérés** sous la forme oxydée et libres d'intervenir pour une autre série de réactions ;

– l'énergie produite au cours de ces oxydations n'est pas libérée globalement mais par petites étapes afin d'être finalement transférée dans des liaisons chimiques riches en énergie dont le modèle est la liaison phosphate de l'ATP.

La diminution de l'énergie libre à chaque étape est de l'ordre de quelques dizaines de kilojoules par mole *(fig. IV.4)*. Lors des sauts énergétiques, une partie de l'énergie sera perdue sous forme de chaleur.

Les catalyseurs si hautement adaptés à l'oxydation d'un substrat sont des **déshydrogénases**. Elles sont spécifiques de ce substrat et sont associées à des coenzymes dont le rôle est d'accepter l'hydrogène du substrat. Ce sont les dérivés flaviniques (FMN, FAD) ou pyridiniques (NAD^+, NADP) et divers autres composés (CoA, vitamines, etc.). Chez les organismes aérobies, le transport des électrons entre les coenzymes des déshydrogénases et l'oxygène moléculaire s'effectue par l'intermédiaire des coenzymes cytochromiques (cytochromes et cytochromes oxydases).

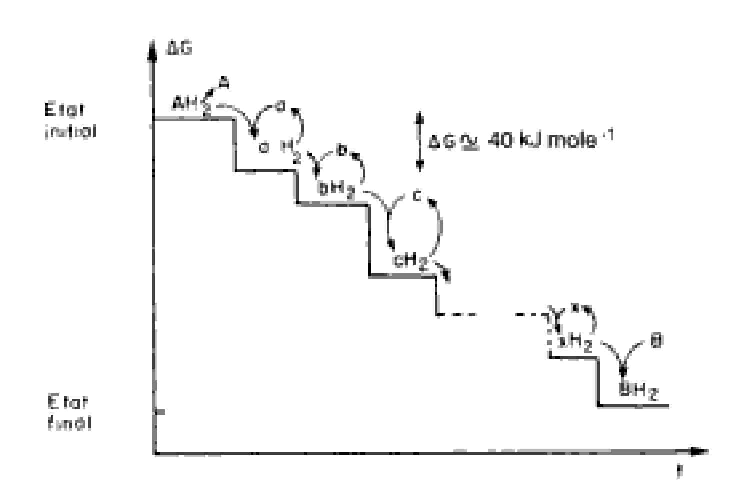


Figure IV.4 – **Variations de l'énergie libre lors des oxydations biologiques.**

Le produit à oxyder (AH_2) passe par une série de produits intermédiaires (aH_2, bH_2... xH_2) pour donner le produit réduit (BH_2). À chaque étape, il y a libération d'une fraction de l'énergie totale (de l'ordre de quelques dizaines de $kJ \cdot mole^{-1}$).

3.2. Types respiratoires

Traditionnellement, lorsque l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire, on parle de respiration et les micro-organismes de ce type sont dits aérobies ; lorsque l'accepteur final est une substance autre que l'oxygène, on parle de fermentation et les microbes sont appelés anaérobies. Dans la fermentation, l'accepteur peut être organique ou inorganique ; certains réservaient les termes « fermentation » au premier de ces types et « respiration anaérobie » au second. Actuellement, depuis que l'on a compris les mécanismes moléculaires en jeu, grâce à la **théorie de Mitchell**, les définitions de la respiration et de la fermentation sont plus précises.

La **respiration** correspond, chez un organisme, à la possession d'une **chaîne de transport électronique** liée à une **membrane cellulaire** et entraînant un **flux unidirectionnel d'électrons** dans un sens (vers l'intérieur de la cellule dans le cas des procaryotes) et un **flux équivalent de protons** dans l'autre sens (vers l'extérieur), quelle que soit la nature de l'accepteur final (O_2, nitrate, composé organique, etc.) *(fig. IV.5a)*.

La **fermentation** correspond à la présence de **chaînes de transport électronique intracytoplasmique** n'entraînant pas automatiquement de

Copyrighted material

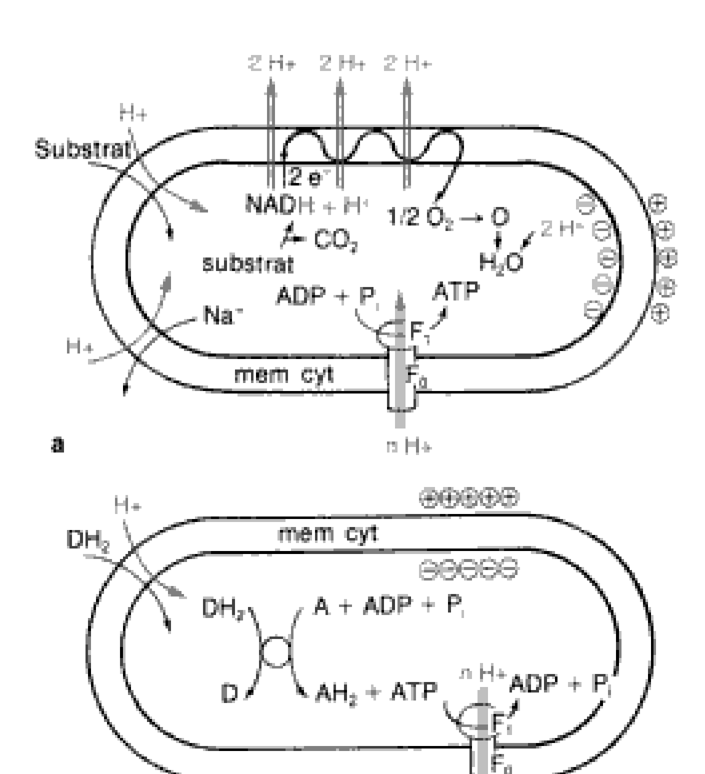


Figure IV.5 –

a : schéma des respirations (transport électronique et protonique membranaire), les protons transférés servent soit à faire de l'ATP soit à assurer d'autres fonctions (transport...) ;

b : schéma des fermentations (avec la possibilité de transfert de protons par l'ATPase fonctionnant en sens inverse) ;

DH_2 : substrat donneur d'électrons.

flux d'électrons ou de protons de part et d'autre d'une membrane cellulaire (un tel flux s'établira secondairement, si nécessaire, à partir de l'ATP produit) *(fig. IV.5b)*.

De ce fait, la respiration d'un organisme **aérobie** correspond à un **transport électronique** et protonique transmembranaire avec l'oxygène moléculaire comme accepteur final ; la **respiration anaérobie** correspond à un transport transmembranaire d'électrons et de protons jusqu'à un **accepteur final d'électrons** autre qu'O_2 (minéral comme les nitrates pour la « respiration nitrate », organique comme le fumarate pour la « respiration fumarate »). Une bactérie dite **anaérobie** peut donc présenter une **chaîne respiratoire** très proche de celle d'un organisme aérobie strict. Beaucoup de micro-organismes possèdent plusieurs types de chaînes de transport électronique qui fonctionnent soit en parallèle, soit en fonction des conditions de culture. *E. coli* possède à la fois une chaîne couplée avec l'O_2 (fonctionnelle en aérobiose), une chaîne pour la **respiration nitrate** (fonctionnelle en anaérobiose sur milieux nitratés) et une chaîne pour la **respiration fumarate** (fonctionnelle en anaérobiose sur milieux contenant ce substrat), tout en ayant également la possibilité de réaliser une fermentation.

3.2.1. Respiration

La respiration est d'abord caractérisée par la **localisation** de la chaîne de transport électronique :

– au niveau de la **membrane cytoplasmique** dans le cas des procaryotes ;

– au niveau de la membrane interne des **mitochondries** dans le cas des eucaryotes.

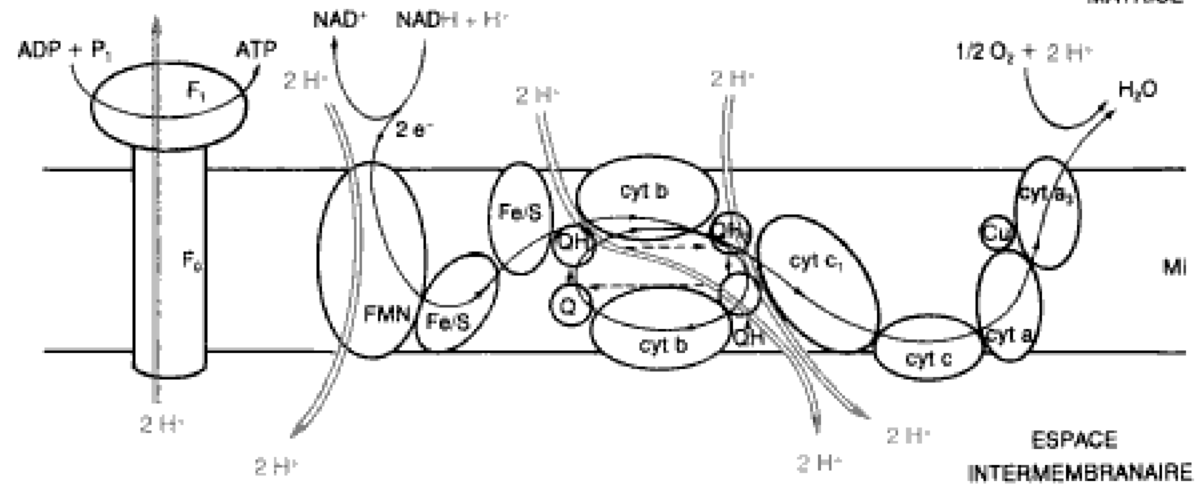
Elle se caractérise de plus par la nature de l'**accepteur final** d'électrons : l'oxygène moléculaire. Le couplage oxydation du substrat et réduction de l'oxygène est assuré par une chaîne de réactions enzymatiques faisant intervenir des déshydrogénases et les coenzymes qui leur sont associées.

Le mode le plus habituel de respiration est connu sous le nom de **voie des cytochromes indirects**. On en connaît parfaitement la composition et le mécanisme dans la cellule eucaryote ainsi que chez certains organismes procaryotes *(fig. IV.6a et b)*. Malgré leur diversité, toutes ces chaînes ont de nombreux points communs, en particulier par la nature des coenzymes qui leur sont associées.

Les électrons et les protons issus des substrats dégradés dans le cytoplasme sont pris en charge par le NAD^+ pour être transportés jusqu'à la membrane au niveau d'une chaîne respiratoire ; ils sont pris en charge par les flavoprotéines (FMN), dont le groupement prosthétique contient du fer et du soufre et quelquefois du molybdène, avant de passer par les coenzymes Q (CoQ), véritables navettes entre les FMN réduites et les cytochromes oxydés ; de plus, les CoQ assurent le découplage du transport de l'atome d'hydrogène en protons et électrons car seuls les électrons sont pris en charge par les cytochromes.

Les cytochromes sont des **hétéroprotéines** à groupement prosthétique **ferroporphyrinique**. Ils peuvent exister sous une forme réduite ou oxydée, le fer se trouvant à l'état ferreux bivalent, ou

Copyrighted material



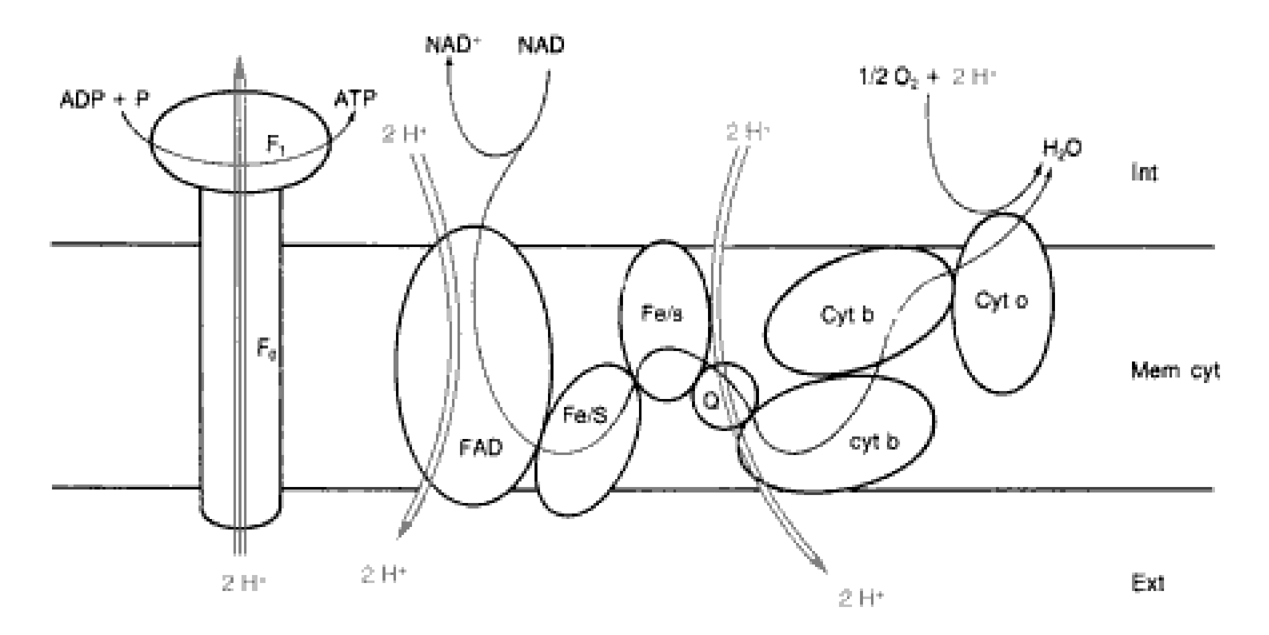


Figure IV.6 – **Chaînes respiratoires.**

a : Chez les mitochondries

La membrane interne contient une chaîne respiratoire qui assure le transport des électrons et des protons provenant du substrat par l'intermédiaire du $NADH^+$. Ils sont cédés au flavine-nomonucléotide ($FMNH_2$) qui fait sortir les 2 protons ; les électrons retournent à la surface interne *via* une protéine Fe/S ; les 2 électrons sont cédés à 2 molécules d'ubiquinone (CoQ) qui avec un proton du milieu interne se réduisent en semiquinone (QH), celle-ci diffuse vers la partie externe de la membrane interne en recevant au passage 2 électrons supplémentaires du cytochrome b et 2 protons de l'intérieur de la mitochondrie donnant de l'hydroquinone (QH_2) ; l'hydroquinone cède les électrons au cytochrome c_1 et libère les protons à l'extérieur, il y a donc un va-et-vient continuel de l'ubiquinone entre les 2 faces de la membrane. Finalement les électrons vont être ramené à l'intérieur de la mitochondrie par les cytochromes c, a et a_3 et transférés à l'oxygène par ce dernier pour donner de l'eau. Il y a donc 3 sites où 2 protons sont expulsés par molécule de $NADH^+$. Une chaîne analogue existe chez les bactéries oxydase +.

b : Chez *E. coli*

La membrane cytoplasmique d'*E. coli* contient une chaîne respiratoire qui présente des analogies avec celle des mitochondries. Les électrons et protons provenant du substrat par l'intermédiaire du $NADH^+$ sont cédés au flavine-adénine-dinucléotide ($FADH_2$) qui fait sortir les 2 protons ; les électrons retournent à la surface interne *via* une protéine Fe/S ; des électrons et 2 protons du milieu interne réduisent une molécule d'ubiquinone (CoQ) en hydroquinone (QH_2) qui diffuse vers la partie externe de la membrane et y libère 2 protons ; finalement les électrons vont être ramenés à l'intérieur de la cellule par les cytochromes b et o et transférés à l'oxygène par ce dernier pour donner de l'eau. Il y a donc 2 sites où 2 protons sont expulsés par molécule de $NADH^+$ (contre 3 dans le cas de chaînes respiratoires plus complexes avec des cytochromes c comme chez les mitochondries ou chez certaines bactéries comme *P. denitrificans*).

Copyrighted material

à l'état ferrique, trivalent. La cytochrome oxydase est le dernier transporteur de la chaîne ; elle catalyse le transfert de l'hydrogène sur l'oxygène moléculaire tandis que son atome de fer est oxydé :

$$Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}.$$

Alors que dans les cellules des organismes supérieurs, les cytochromes sont de nature uniforme, chez les bactéries ils sont très divers, caractérisés par des spectres d'absorption différents Les cytochromes sont présents chez toutes les bactéries aérobies strictes, chez la majorité des bactéries anaérobies facultatives (celles qui peuvent utiliser l'oxygène) et même chez certaines bactéries anaérobies strictes. Ils sont localisés dans la membrane cytoplasmique.

La membrane cytoplasmique d'*E. coli* contient une chaîne respiratoire qui présente des analogies avec celle des mitochondries *(fig. IV.7)*. Elle comporte la séquence :

$$CoQ/cyt\ b/cyt\ o/O_2.$$

D'autres cytochromes ont été identifiés chez *E. coli* mais ils ne participent pas tous au transport électronique dans la chaîne respiratoire membranaire.

Les électrons et protons provenant du substrat par l'intermédiaire du NADH sont cédés au flavine-adénine-dinucléotide (FADH) qui libère 2 protons ; les électrons retournent à la surface interne *via* une protéine Fe/S ; des électrons et 2 protons du milieu interne réduisent une molécule d'ubiquinone (CoQ) en hydroquinone (2) qui diffuse vers la partie externe de la membrane et y libère 2 protons ; puis les électrons vont être ramenés à l'intérieur de la cellule par les cytochromes b et o et transférés à l'oxygène par ce dernier pour donner de l'eau. Finalement, il existe 2 sites où 2 protons sont expulsés par une molécule de NADH contre 3 dans le cas de chaînes respiratoires plus complexes avec des cytochromes c comme chez les mitochondries ou chez certaines bactéries comme *P. denitrificans* chez qui on trouve une séquence très proche de celle des mitochondries :

$$CoQ/cyt\ b/cyt\ c/cyt\ a + a_3/O_2.$$

Les diverses séquences se différencient par :

– le nombre de cytochromes en jeu ;

– la nature des cytochromes et, en particulier, la présence ou non d'un cytochrome c ;

– la nature du cytochrome terminal qui assure le transfert des électrons à l'oxygène moléculaire, quelle que soit sa nature (cyt o chez *E. coli*, cyt a3 chez *P. denitrificans*, etc.) ; on l'appelle, de façon générale, « cytochrome oxydase ». Il ne faut pas confondre ce terme, qui désigne une protéine responsable de la réaction :

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O.$$

avec ce que l'on a coutume d'appeler, au laboratoire, la « réaction à l'oxydase » (voir § 8.4.1.)

Au niveau de la membrane où se crée un **gradient électrochimique**, il y a de 1 à 3 sites où des paires de protons sont transférées ; les chaînes les plus primitives n'ont en général que 1 site alors que les chaînes plus complexes, comme celles des mitochondries, en possèdent 3 ; les bactéries se situent souvent en position intermédiaire avec 2 sites ; pour une même quantité de substrat énergétique, le rendement pourra donc varier d'un facteur 3.

Lorsque l'accepteur final est soit un composé **minéral oxygéné** (nitrate, sulfate, carbonate, tétrathionate, etc.), soit un composé **organique non fermentescible** (fumarate, formiate, acétate, etc.), on a coutume de parler alors de « respiration anaérobie » (respiration nitrate, fumarate, etc.).

Dans le cas des nitrates, la dernière étape est catalysée par la « NRA » membranaire (nitrate réductase A dissimilatrice) :

$$NADH + H^+ + NO_3^- \rightarrow NAD^+ + NO_2^- + H_2O.$$

Cette réaction s'accompagne de la création d'un **gradient de protons** (une paire de protons par molécule de nitrate réduite). Les nitrites peuvent soit s'accumuler (mais ils sont relativement toxiques), soit être dégradés à leur tour, mais sans production d'énergie éventuellement jusqu'au stade azote :

$$2NO_3H \rightarrow 2NO_2H \rightarrow 2\ (NOH) \rightarrow N_2O \rightarrow N_2.$$

Les sulfates sont le plus souvent réduits en H_2S (bactéries sulfatoréductrices). Certaines bactéries possèdent une hydrogénase qui assure l'élimination des électrons et des protons selon la réaction :

$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2.$$

Dans le cas des composés organiques non fermentescibles (la respiration fumarate étant la plus connue), il y a également formation d'un gradient de protons *(fig. IV.8)*.

Certaines bactéries (*K. pneumoniae*, *S. typhi murium*, etc.) utilisent des composés organiques non fermentescibles (oxaloacétate) pour créer un **gradient de Na^+** servant soit au transport de substrat (citrate chez *K. pneumoniae*), soit à la production d'ATP par une ATPase Na^+ dépendante tout à fait analogue à l'ATPase H^+ dépendante.

À côté de la phosphorylation oxydative du substrat (voir § 3.4.2.1.), d'autres voies existent en particulier la voie oxydative directe qui fait appel à des enzymes auto-oxydables qui transfèrent les électrons du substrat à l'oxygène avec formation d'eau oxygénée ou d'ions superoxydes :

$$FADH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{FAD oxydase}} FAD + H_2O_2$$

Ces produits sont toxiques et doivent être rapidement dégradés par les catalases, peroxydases ou superoxydes dismutases pour éviter la mort des bactéries.

Copyrighted material

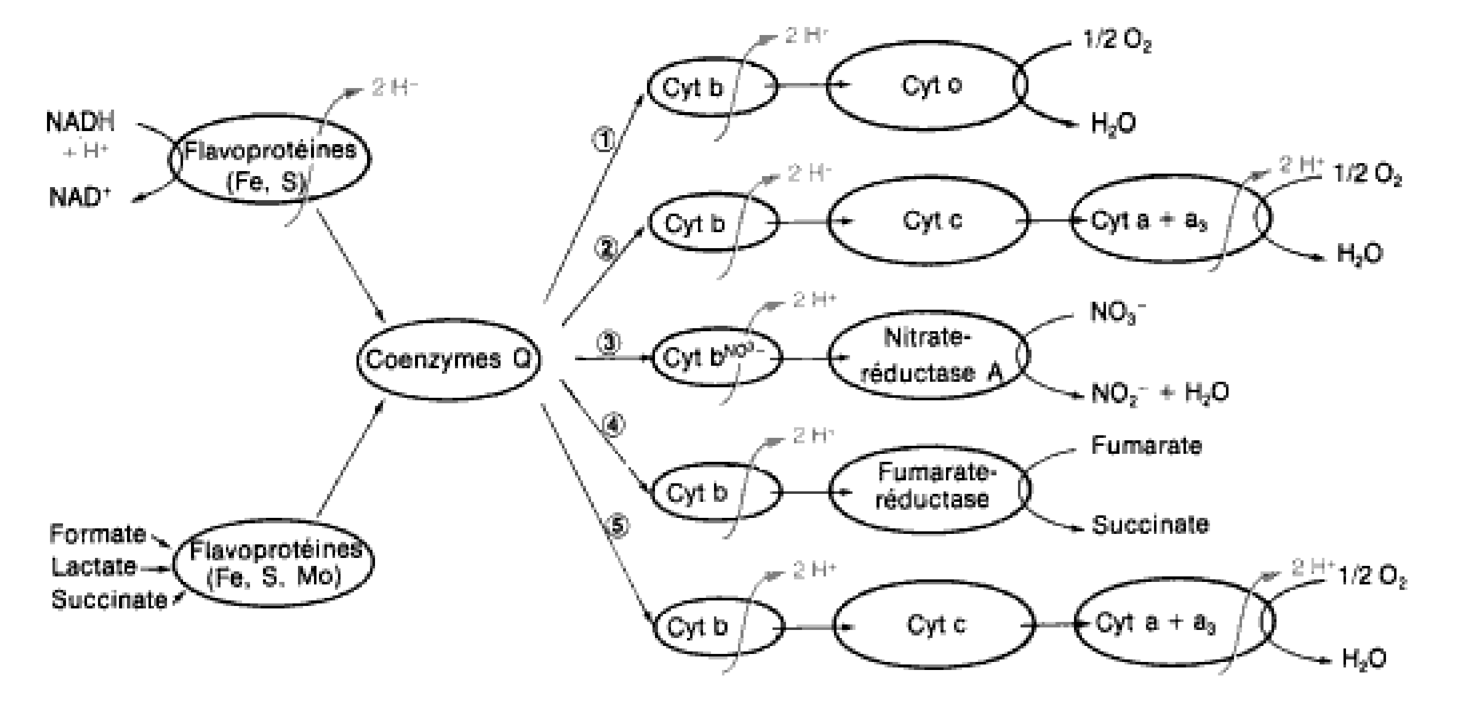


Figure IV.7 – **Quelques types de chaîne respiratoire.**

1. Respiration aérobie chez *E. coli*. 2. Respiration aérobie chez *P. denitrificans*. 3. Respiration nitrate (chez *E. coli* dans le cas d'une culture anaérobie sur milieu nitraté). 4. Respiration fumarate (chez *E. coli* avec du fumarate et du formiate comme seule source de C et d'énergie). 5. Respiration aérobie des mitochondries. 2 H^+ indiquent les endroits où une paire de protons est transférée de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur créant ainsi un gradient électrochimique, il y a de 1 à 3 sites où des paires de protons sont transférées ; les chaînes les plus primitives n'ont en général qu'un site alors que les chaînes élaborées comme celle des mitochondries possèdent 3 sites, les bactéries se situant souvent en position intermédiaire avec 2 sites ; pour une même quantité de substrat énergétique le rendement pourra donc varier d'un facteur 3.

Deux mécanismes sont possibles :

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + 1/2\ O_2$$

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{\text{peroxydase}} 2H_2O.$$

Ces voies sont peu ou pas énergétiques. Une bactérie qui possède une telle voie sans avoir de catalase est en fait anaérobie stricte car l'oxygène est toxique pour elle.

Certaines bactéries **aérotolérantes** comme les *Streptococcus*, qui n'ont pas de catalase, possèdent des enzymes flaviniques (NAD oxydase et NAD peroxydase) leur permettant de réaliser un équivalent de respiration cytoplasmique.

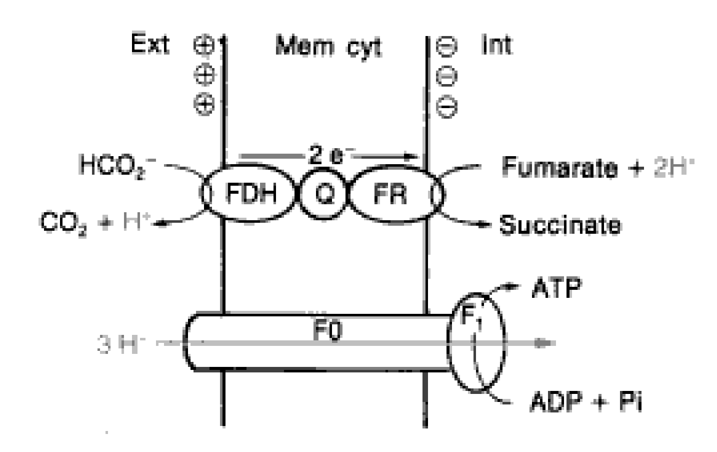


Figure IV.8 – **Schéma de la respiration fumarate.**

Grâce à une chaîne de transport électronique membranaire formé de la formiate-déshydrogénase (FDH), d'un coenzyme Q (la ménaquinone) et de la fumarate réductase (FR) il y a formation d'un gradient de protons utilisable par l'ATPase.

3.2.2. Fermentation

C'est aussi un **processus d'oxydoréduction**, mais les accepteurs finals d'électrons sont des **composés organiques** et non pas des molécules d'oxygène. Ce processus libère également de l'énergie, mais nettement moins que la respiration. L'oxydation complète d'une molécule de glucose (respiration) en CO_2 et H_2O produit environ 2 800 kJ tandis que sa fermentation en acide lactique, par exemple, ne libère que 94 kJ.

Ce qui caractérise en deuxième lieu ce type respiratoire, c'est la nature des transporteurs d'électrons. Le NAD^+ et le $NADP^+$ sont pratiquement les seuls rencontrés *(fig. IV.9)*. La nature des produits finaux est fonction de la variété des

Copyrighted material

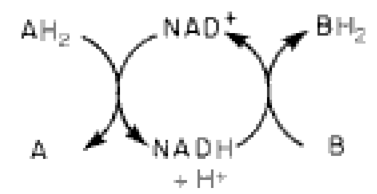


Figure IV.9 – **Mécanisme de transport électronique dans la fermentation.**

Le donneur (AH_2) et l'accepteur (B) d'électrons sont des composés organiques. Le transport des électrons est assuré par le NAD^+.

substrats : sucre, acide organique, acide aminé, purine, pyrimidine, etc.

3.3. Étude du métabolisme énergétique

La diversité des schémas au cours des réactions d'oxydoréduction peut être mise à profit pour identifier les bactéries, d'autant que certaines des recherches proposées sont simples et rapides.

3.3.1. Type respiratoire

Pour définir le type respiratoire d'une bactérie, on utilise au laboratoire le milieu VF (viande-foie) qui a été régénéré et coulé en tube profond : quatre types principaux peuvent être reconnus comme le montre la *figure III-4* (voir chap. III).

3.3.2. Réaction de l'oxydase

Elle permet de mettre en évidence l'existence d'une chaîne respiratoire fonctionnant avec le cytochrome c membranaire qui a un potentiel redox identique à celui du TMPD (tétra-méthyl-paraphénylène diamine). Cette réaction est particulièrement utile chez les bactéries à Gram négatif : elle est positive avec les bactéries aérobies strictes (sauf *Ps. maltophilia et Acinetobacter*) ; elle est négative avec les bactéries aéro-anaérobies facultatives excepté les *Vibrio* et les *Aeromonas ;* en particulier chez les entérobactéries, la réaction est négative, bien que ces bactéries possèdent une chaîne respiratoire avec des cytochromes mais ceux-ci sont de type b ou o.

3.3.3. Catalase

La catalase est habituellement présente chez les bactéries à Gram positif sauf dans les genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*. En présence d'H_2O_2, une suspension de bactéries catalase positive libère de l'oxygène.

3.3.4. Nitrate réductase

La réduction des nitrates, que l'on peut rechercher sur un milieu à base de nitrate (bouillon ou gélose) par la mise en évidence des nitrites (par le réactif de Griess), peut résulter de deux mécanismes différents.

Le premier est la **réduction assimilatrice**, catalysée par la nitrate réductase B, qui conduit à des nitrites qui pourront être métabolisés par la suite en sels d'ammonium, l'ion NH_4^+ constituant une source d'azote utilisable.

Le second est la **réduction dissimilatrice** ou « respiration nitrate ». Sous la dépendance de la nitrate réductase A et d'autres enzymes, les nitrates seront totalement réduits en oxyde nitreux (N_2O) et, surtout, en azote (N_2) qui sera éliminé. La respiration nitrate est faite en anaérobiose.

3.3.5. Type métabolique

Cette recherche se fait en utilisant le glucose comme substrat, ce sucre étant le plus universellement utilisé par les bactéries. Le milieu d'étude est soit le milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG), soit le milieu Hugh et Leifson. Il faut incuber en aérobiose et en anaérobiose.

Quatre cas peuvent se présenter après culture *(fig. IV.10)*. On dit que les bactéries sont :

– **fermentantes** en présence d'une culture et d'une acidification dans les deux tubes ;

– **oxydantes** lorsqu'elles produisent une acidification seulement en aérobiose ;

– **inactives** en absence d'acidification dans les deux milieux ;

– **alcalinisantes** lorsqu'on observe une alcalinisation en aérobiose, ce qui traduit une utilisation des peptones.

Copyrighted material

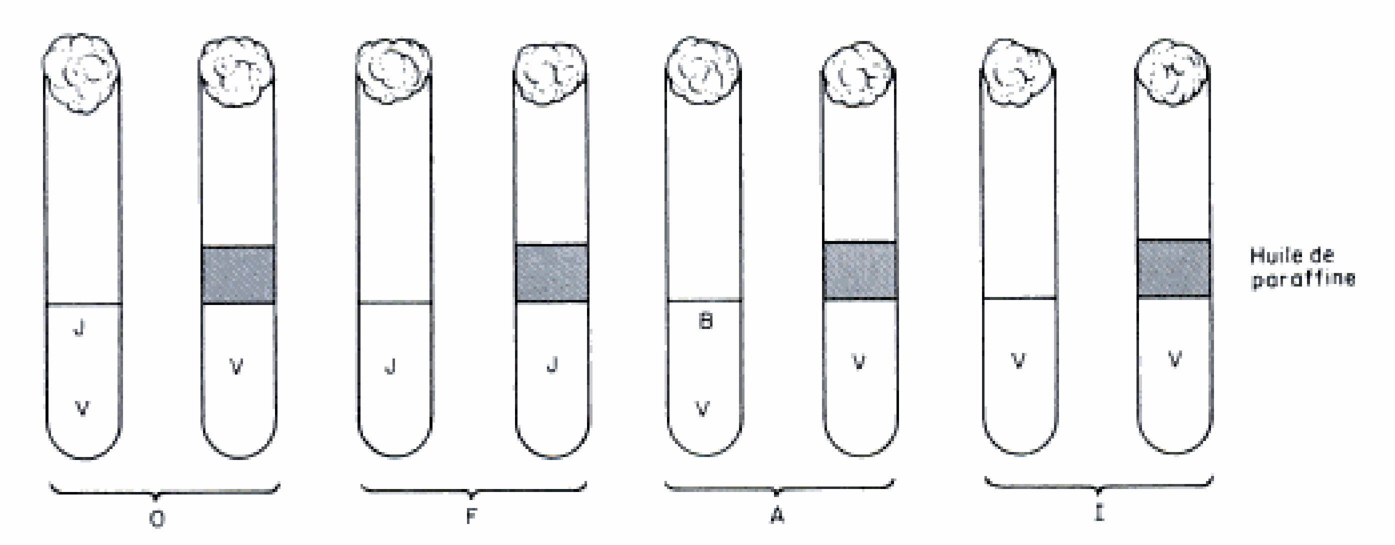


Figure IV.10 – Recherche du type métabolique.

La recherche se fait en milieu Hugh et Leifson en utilisant deux tubes dont l'un est recouvert d'huile de paraffine (anaérobiose), les milieux verts (v) au départ peuvent virer soit au jaune (j) soit au bleu (b). Quatre cas sont possibles : O : oxydatif, F : fermentatif, A : alcalinisant, I : inactif.

3.3.6. Réduction des dérivés soufrés

La réduction des divers composés oxygénés du soufre (sulfate, sulfite, thiosulfate, etc.) est mise en évidence par la production d'hydrogène sulfuré révélé sous forme de sulfure métallique noir (sulfure de fer ou de plomb).

3.4. Stockage et utilisation de l'énergie

3.4.1. Liaisons riches en énergie

La cellule stocke l'énergie au niveau de composés qui pourront la libérer facilement dans des conditions compatibles avec la vie de la cellule (milieu aqueux à 20-40 °C). Une réaction chimique bien adaptée à ces conditions est l'hydrolyse de la liaison ester-phosphate (O~P) ; le composé le plus utilisé par la cellule est l'ATP. D'autres composés sont également riches en énergie (si leur hydrolyse libère plus de 21 $kJ \cdot mole^{-1}$) :

– les nucléosides (UTP, GTP, CTP, TTP) ;
– les acylphosphates

$$R - \overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C} - O \sim P$$

par exemple, l'acétylphosphate ($\Delta G = -42{,}2\ kJ \cdot mole^{-1}$), le 1-3 diphosphoglycérate ($\Delta G = -49{,}3\ kJ \cdot mole^{-1}$) ;

– les énolphosphates

$$R - \overset{\overset{\displaystyle CH_2}{\|}}{C} - O \sim P$$

par exemple, PEP ($G = -53{,}5\ kJ \cdot mole^{-1}$) ;

– l'acylthioester

$$R - \overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C} - S \sim P$$

par exemple, la coenzyme A.

3.4.2. Origine

L'ATP peut être synthétisé par deux types de mécanismes :

– la phosphorylation au niveau du substrat, qui a lieu dans le cytoplasme ;

– la **phosphorylation liée à un gradient électrochimique** de protons et qui se déroule au niveau de la membrane cytoplasmique (dans cette catégorie, on trouve aussi bien la phosphorylation oxydative que la photophosphorylation).

Dans l'un ou l'autre cas, cette synthèse est réalisée aux dépens de l'ADP et du phosphate inorganique.

Copyrighted material

3.4.2.1. *Phosphorylation au niveau du substrat*

Au cours de l'oxydation du substrat, un phosphate inorganique est lié par voie enzymatique à l'un des produits de dégradation. Le composé oxydé est porteur d'une liaison phosphate, riche en énergie, qui peut ensuite être transférée à un ADP. Ce mode de formation de l'ATP est rencontré au cours de deux étapes de la dégradation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof : l'oxydation du 3-phosphoglycéraldéhyde en acide 1-3-diphosphoglycérique et la transformation de ce dernier en acide pyruvique. La phosphorylation au niveau du substrat constitue le mode principal de formation d'ATP au cours de la fermentation.

3.4.2.2. *Phosphorylation liée au gradient de protons*

Lors du transfert d'électrons au cours de la respiration (aérobie ou anaérobie) ainsi que lors de la photosynthèse, il y a création d'un important gradient de protons qui représente une réserve d'énergie (comparable à un condensateur électrique chargé), réserve qui peut être récupérée en laissant les protons retourner de l'autre côté de la membrane à travers une structure que l'on pourrait comparer à un petit moteur fabriquant de l'ATP *(fig. IV.2)*.

L'**énergie du gradient** peut se décomposer en deux termes :

– la différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane et qui est à l'origine d'une différence de pH (environ 2 unités chez *E. coli,* l'extérieur étant plus acide) ;

– la **charge électrique** portée par les protons qui crée une différence de potentiel et un champ électrostatique (environ 70 mV chez *E. coli,* l'extérieur étant le côté positif).

Cette force proton-motrice peut être utilisée comme source d'énergie pour la phosphorylation (mais aussi pour le transport, etc.). Les enzymes qui permettent le retour des protons à travers la membrane tout en assurant la synthèse d'ATP sont tout à fait semblables chez les mitochondries, les bactéries et les chloroplastes ; ce sont des amas globulaires saillant à la surface de la membrane formés de deux parties :

– une partie appelée $\mathbf{F_1}$ (ou CF_1 dans les chloroplastes) formant une protubérance sur la partie interne de la membrane ;

– une partie appelée $\mathbf{F_0}$ située dans la membrane et à laquelle est rattachée la partie F_1.

Ce complexe F_1-F_0 est capable, chaque fois que 2 ou 3 protons le traversent dans le sens extérieur-intérieur, de synthétiser une molécule d'ATP. Le nombre de protons nécessaire pour la synthèse d'un ATP semble dépendre de l'organisme considéré :

– pour les mitochondries, il serait de 2 ;

– pour les chloroplastes et probablement pour la plupart des bactéries, il serait de 3.

Pour établir les bilans énergétiques, il faut tenir compte de l'**énergie libre** nécessaire à la **synthèse de l'ATP** qui peut ainsi varier de 29 à 62 $kJ \cdot mole^{-1}$; or, celle-ci dépend des concentrations respectives en substrats (ADP et phosphates) et en produit (ATP). Une forte concentration en substrats liée à une faible concentration en produit (ce qui est le cas d'une cellule très active qui consomme l'ATP à grande vitesse) diminue l'énergie libre nécessaire. Chez *E. coli*, l'énergie libre du gradient électrochimique est d'environ 18 $kJ \cdot mole^{-1}$ de protons (dans les mitochondries, il est d'environ 22 $kJ \cdot mole^{-1}$). Dans les conditions ordinaires de la vie bactérienne, on peut estimer que la synthèse d'ATP requiert de l'ordre de 50 $kJ \cdot mole^{-1}$ ce qui, compte tenu de l'énergie du gradient de protons, correspondrait bien à l'utilisation de 3 protons par ATP. Il n'est cependant pas exclu que cette énergie soit quelquefois plus faible, de l'ordre de 30 à 35 $kJ \cdot mole^{-1}$ (en particulier en cas d'anabolisme très intense créant une forte consommation d'ATP) ; il suffirait alors de 2 protons pour la synthèse d'un ATP. À l'inverse, lorsque la chaîne électronique membranaire n'assure pas le transfert de protons (chaîne absente ou défaut d'accepteur d'électrons), l'**ATP synthétase** voit sa **fonction inversée**, elle dégrade alors de l'ATP (provenant par exemple de phosphorylations liées au substrat) pour produire un gradient de protons (2 ou 3 H^+ par ATP hydrolysé en ADP). Ce gradient assurera en particulier les transports actifs transmembranaires.

3.5. Conclusion

On doit insister sur le rôle du métabolisme énergétique car la biosynthèse cellulaire, la croissance et la multiplication microbienne dépendent avant tout de l'énergie produite par la cellule. Le métabolisme tend essentiellement à produire de l'ATP. Quel que soit le mode des réactions énergétiques,

Copyrighted material

la priorité absolue est bien la synthèse de l'ATP. Lipmann l'a fort bien rappelé lorsqu'il a dit, à propos des fermentations : « Les fermentations n'ont pas pour fonction de synthétiser de l'acide propionique ou de l'alcool, mais de l'énergie sous forme d'ATP. » Les différentes voies métaboliques englobent donc des réactions énergétiques et des réactions non énergétiques. Les premières sont essentielles mais les secondes, sous un certain aspect, sont tout aussi importantes car elles sont la source de nombreux produits intermédiaires, points de départ de nouvelles synthèses. Ainsi, dans la respiration comme dans la fermentation, les voies du métabolisme d'une part servent à la production d'énergie et, d'autre part, elles aboutissent à des corps intermédiaires précurseurs des macromolécules. Notre étude s'attachera à montrer l'importance de chacune d'entre elles tant au niveau du métabolisme intermédiaire avec les sous-produits engendrés et les réactions « clés » mises en œuvre qu'à celui du métabolisme énergétique. Pour les détails des réactions et des formules, on se reportera si besoin est à un ouvrage de biochimie.

4. Métabolisme glucidique

4.1. Catabolisme

Tous les glucides sont susceptibles d'être catabolisés. Le glucose est le plus utilisé, soit à partir du milieu où il est présent soit après libération à partir des polysaccharides.

4.1.1. Glucose

Alors que, chez les eucaryotes, la totalité du glucose est métabolisée par la voie de la glycolyse, les micro-organismes possèdent une variété d'autres voies qui fonctionnent souvent en parallèle *(fig. IV.11)*. Notre étude s'attachera à montrer l'importance de chacune d'entre elles tant au niveau du métabolisme intermédiaire avec les sous-produits engendrés et les réactions « clés » mises en œuvre qu'à celui du métabolisme énergétique. Pour les détails des réactions et des formules, on se reportera si besoin à un ouvrage de biochimie.

4.1.1.1. Voie d'Embden-Meyerhof (EM) ou glycolyse

Elle a été la première voie connue. C'est celle qui est suivie aussi bien chez les animaux (muscles) que chez les levures et chez un grand nombre de bactéries aérobies, anaérobies strictes ou facultatives. Tous ces organismes cependant ne forment pas les mêmes produits finaux. Il y a un tronc commun jusqu'au pyruvate *(fig. IV.12)* dans lequel se trouvent les réactions caractéristiques de cette voie, à savoir :

– l'**activation** du glucose (a) ;

– le **clivage** de l'hexose par l'**aldolase** (b) (enzyme « clé ») ;

– la formation de deux trioses (c) ;

– la **phosphorylation** oxydative du triose-phosphate (d) (avec comme coenzyme le NAD^+) avec libération d'énergie ;

– la formation d'**ATP** (e) ;

– la production finale de **pyruvate**.

Le bilan s'établit comme suit (Glc = glucose ; Pyr = pyruvate) :

$$\text{Glc} + 2\ \text{NAD}^+ + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \rightarrow 2\ \text{Pyr} + 2\ (\text{NADH} + \text{H}^+) + 2\ \text{ATP}.$$

Le rendement énergétique, de l'ordre de 2 %, est faible, l'énergie restante étant accumulée dans les NADH et surtout dans le pyruvate. Il faut se rappeler qu'une seule liaison C-C du glucose a été coupée.

4.1.1.2. Destinée du pyruvate

Selon l'équipement enzymatique des espèces bactériennes, on obtiendra différents produits de fermentation à partir du pyruvate *(fig. IV.13)* ; il peut aussi être complètement oxydé. De nombreuses fermentations ont un intérêt industriel ou diagnostique.

Copyrighted material

Glucose

Embden-Meyerhof → Fructose 6-P → 3-P glycéraldéhyde → Pyruvate

Warburg-Christian → 6-P gluconate → Fermentation hétérolactique ; Entner-Doudoroff

Fermentation hétérolactique → Warburg Dickens Horecker → Fructose 6-P

Fermentation hétérolactique → Lactate ; Ethanol

Entner-Doudoroff → CO_2 ; Ethanol

Pyruvate ⇄ Lactate

Pyruvate → Cycle de Krebs → CO_2 ; Fermentation

Figure IV.11 – **Principales voies de dégradation de glucose chez les bactéries.**

• **Fermentation alcoolique**. Cette fermentation, qui est à la base de la fabrication du vin, de la bière et du pain, est réalisée par des levures dont *Sc. cerevisiae* est la plus courante (levure de boulangerie).

Pyr → Acétaldéhyde → Éthanol

NADH + H^+ → NAD^+

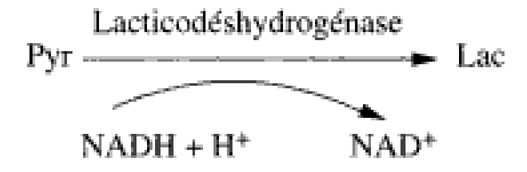
Le bilan global de la réaction peut s'établir comme suit (Eth = éthanol) :

$$\text{Glc} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ \text{Eth} + 2\ \text{ATP}$$

Le bilan énergétique se solde par la production de 2 ATP, soit un rendement de l'ordre de 2 %.

En milieu alcalin, la fermentation s'accompagne d'autres produits (glycérol, acétate) qui peuvent être responsables de la « maladie du vin ». En dehors de son importance dans l'alimentation, cette fermentation est aussi utilisée à des fins industrielles (production d'alcool pour le « carburol »).

Fermentation homolactique. Réalisée entre autres par les *Streptococcus*, de nombreux *Lactobacillus* et certains *Bacillus* et moisissures, c'est la fermentation principale du lait qui conduit au yaourt et au fromage frais ; elle intervient aussi dans l'élaboration du fourrage en silo (*L. plantarum* est l'espèce principale qui, par la production de l'acide lactique, entraîne un abaissement du pH propice à la conservation). Elle peut s'exprimer par la réaction (Lac = lactate) :



Le bilan global est le suivant :

$$1\ \text{Glc} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \rightarrow 2\ \text{Lac} + 2\ \text{ATP}.$$

Au laboratoire, elle se caractérise par l'abaissement du pH (virage d'un indicateur).

• **Fermentation acide mixte** *(fig. IV.14)*. Effectuée essentiellement par les entérobactéries, elle se caractérise par la grande diversité des produits de fermentation, diversité encore accrue en fonction des conditions du milieu.

Copyrighted material

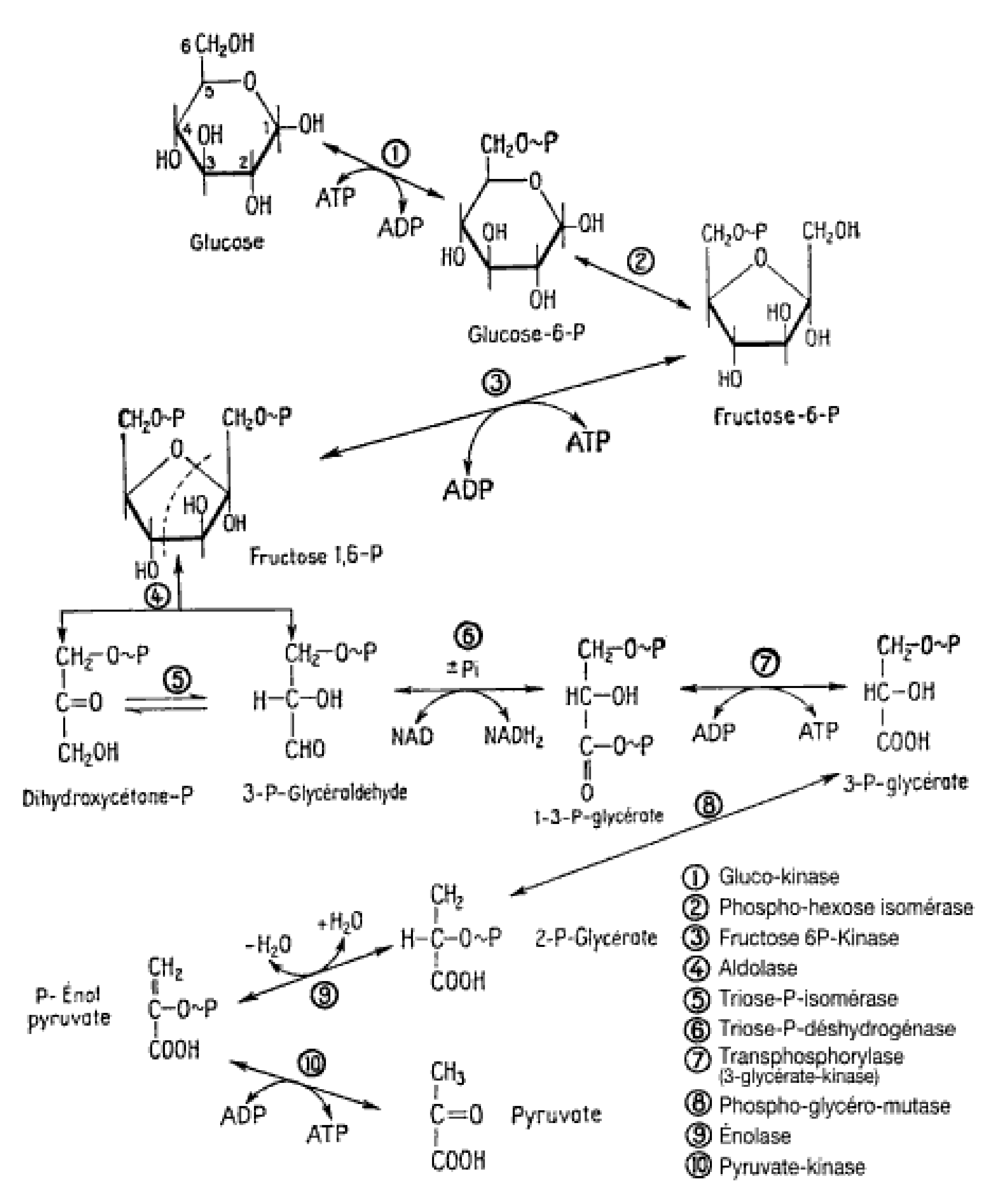


Figure IV.12 – **Voie glycolytique Embden-Meyerhof.**

Avec *E. coli* à pH 6-6,2 (légèrement acide), le bilan approximatif s'établira comme suit (Ac = acétate ; Suc = succinate) :

$9\,Glc \rightarrow 5\,Eth + 4\,Ac + 8\,Lac + 1\,Suc + 8\,CO_2 + 8\,H_2$.

À pH 7,8-8 (légèrement alcalin), il sera différent (For = formiate) :

$9\,Glc \rightarrow 5\,Eth + 9\,For + 4\,Ac + 7\,Lac + 1{,}5\,Suc$.

Cette différence est due à l'enzyme « hydrogène lyase » qui, en milieu acide ou neutre, décompose l'acide formique en CO_2 et H_2.

Dans les deux cas, des traces de nombreux autres produits seront obtenues (acétone, butanediol, glycérol, etc.). Avec d'autres entérobactéries comme les *Serratia*, à pH 6,5, les proportions seront différentes :

$$10\,Glc \rightarrow 6\,butanediol + 6\,Eth + 5\,For + 1\,Lac + 1\,Suc + 12\,CO_2.$$

On voit donc l'importance du pH du milieu sur la fermentation (beaucoup de gaz en milieu acide, pas de gaz en milieu basique).

Copyrighted mater

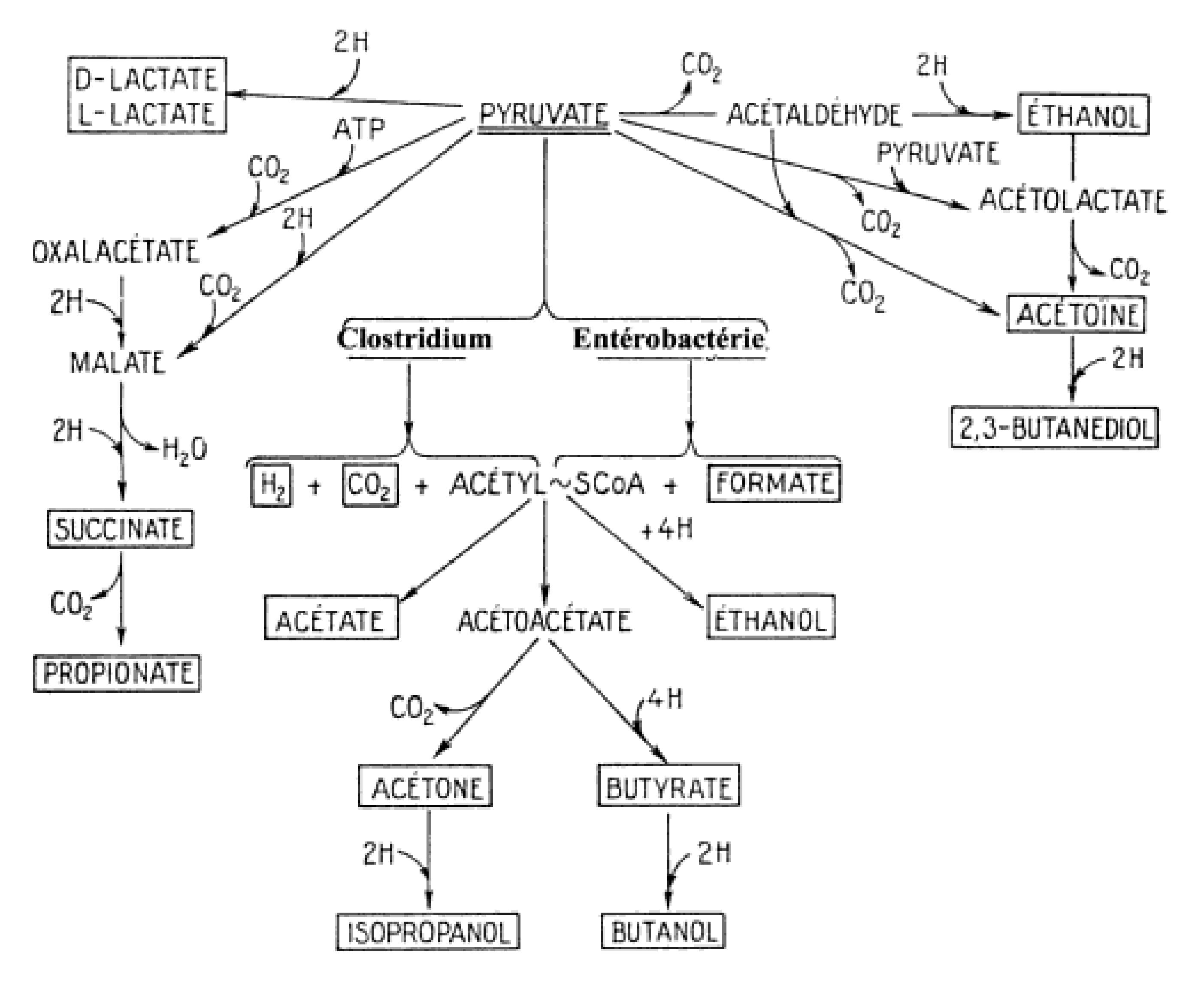


Figure IV.13 – **Principales voies fermentaires à partir de pyruvate.**
(D'après Wood W.A. in « The Bacteria », vol. 2, Academic Press, New York, 1961).

Ces fermentations peuvent s'accompagner de la production d'autres produits :

– l'**acétoïne** qui, par oxydation à l'air, donne du diacétyl (responsable du goût du beurre et produit lors de la maturation de la crème) ;

– le **butanediol** qui peut être transformé en butadiène et servir pour la synthèse du caoutchouc synthétique.

Enfin, le diagnostic des entérobactéries repose en partie sur la mise en évidence de ces produits de fermentation.

• **Fermentation des bactéries anaérobies strictes.** On peut distinguer essentiellement trois sortes de fermentations.

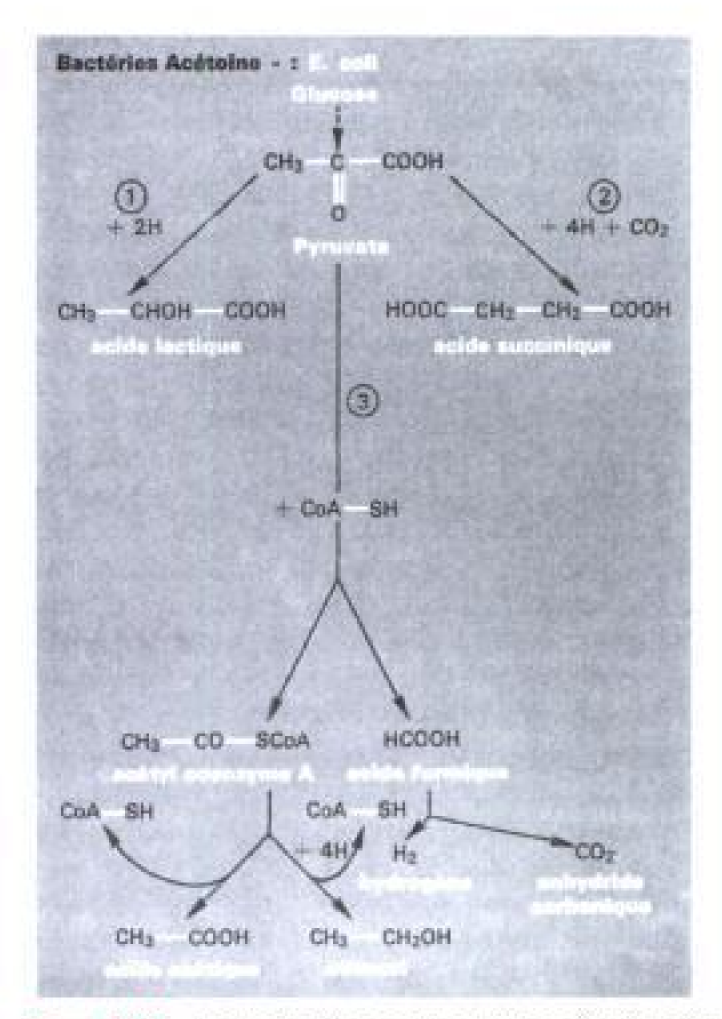
• **Fermentation butanoïque** (anciennement butyrique). Réalisée par *Cl. butyricum, Cl. perfringens,* et d'autres, elle donne lieu aux sous-produits suivants (Bty = butyrate) :

$$4\ Glc \rightarrow 2\ Ac + 3\ Bty + 8\ CO_2 + 10\ H_2.$$

C'est la fermentation type des boîtes de conserve avariées, caractérisée par une mauvaise odeur, de la production de gaz, de l'acidité.

Cl. tyrobutyricum, que l'on trouve souvent en grande quantité dans l'ensilage, peut se retrouver dans le lait et provoquer dans les meules de gruyère ou d'emmenthal une fermentation de l'acide lactique en acide butyrique et hydrogène provoquant leur éclatement.

Copyrighted material



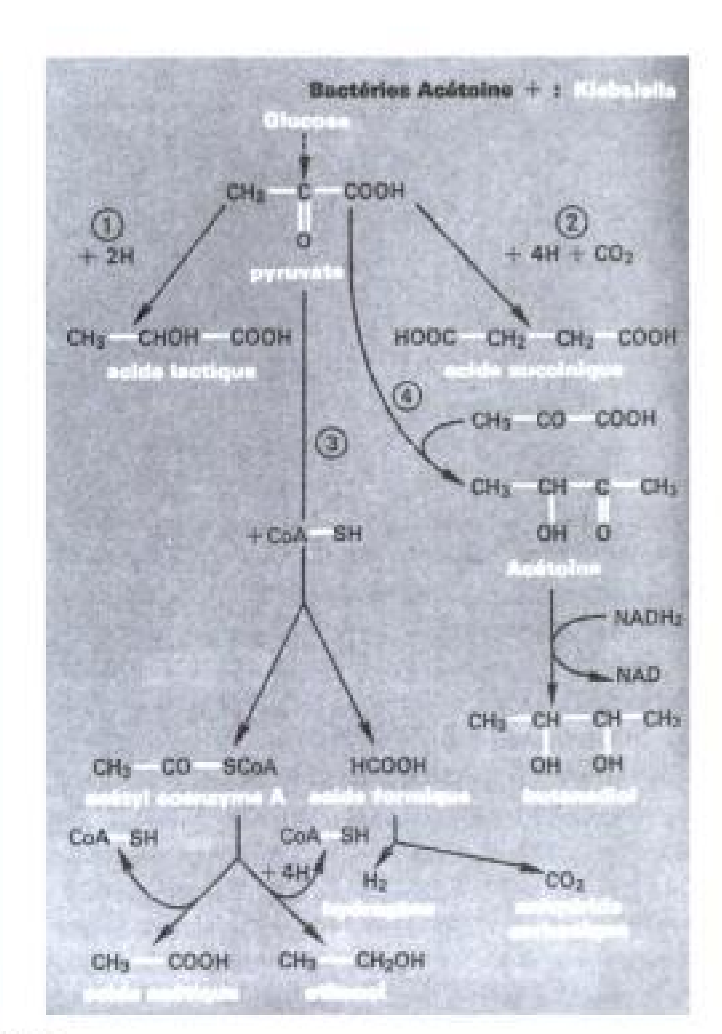


Figure IV.14 – Fermentations acides mixtes et butanediolique.

• **Fermentation acétonobutylique**. *Cl. acetobutylicum* donne naissance à (but = butanol) :

$$5\ \text{Glc} \rightarrow 3\ \text{But} + 1\ \text{Ac} + 1\ \text{acétone} + 11\ CO_2 + 8\ H_2.$$

Cette fermentation, par sa production de substances énergétiques (acétone, butanol, H_2), peut servir à valoriser les déchets agricoles pour fabriquer du carburant. Elle a été utilisée par les Allemands lors de la Première Guerre mondiale pour la fabrication d'explosifs à partir de l'acétone.

• **Fermentation propionique**. Effectuée par les *Propionibacterium*, elle produit, à partir du glucose ou du lactate, un mélange d'acétate, de propionate et de CO_2 en proportions variables. Elle correspond à la fermentation secondaire de certains fromages à pâte cuite (gruyère, emmenthal...), l'acide propionique intervenant dans la saveur et le CO_2 étant à l'origine des trous :

$$3\ \text{Glc} \rightarrow 4\ \text{Pro} + 2\ \text{Ac} + 2\ CO_2.$$

Les *Propionibacterium* sont également les hôtes du tube digestif des ruminants où ils participent à l'assimilation alimentaire.

4.1.1.3. Solutions de remplacement à la glycolyse

D'autres possibilités de dégradation du glucose existent dans le monde microbien ; deux voies vont retenir notre attention du fait de leur importance.

• **Fermentation hétérolactique** *(fig. IV.15 et IV.16)*. Cette voie fait suite à celle de Warburg-Christian. On l'appelle aussi voie des pentoses phosphates ou voie de Dickens et Horecker (qui l'ont découverte en 1955). Elle se retrouve chez des *Lactobacillus*, diverses entérobactéries et les *Leuconostoc*. Elle est caractérisée par :

– une **activation** du glucose (a) ;

– deux **oxydations** successives du glucose-6⁻ P (b, c) ;

– une **décarboxylation** donnant un pentose (d) ;

– la **dégradation** des pentoses par l'enzyme « clé » : la pentulose phosphocétolase (e) ;

Copyrighted material

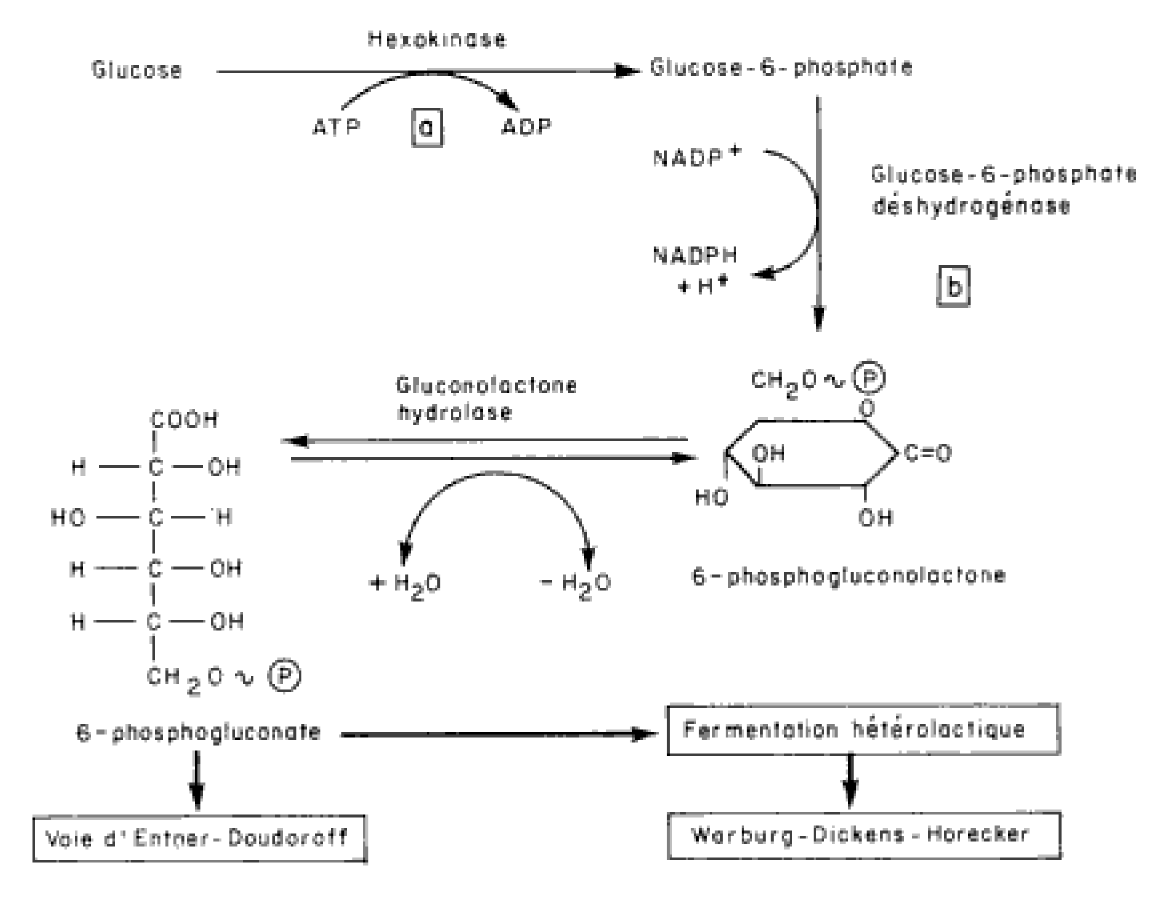


Figure IV.15 – **Voie de Warburg et Christian.**

– une partie **commune** avec la voie d'Emden-Meyerhof : dégradation du 3-P-glycéraldéhyde (f).

Cette voie peut aussi être suivie lors de la dégradation des pentoses (par l'intermédiaire du stade ribose-P). Les *Lactobacillus* qui utilisent les pentoses possèdent souvent une acétokinase qui leur permet la réaction (Rib = ribose) :

acétyl P + ADP → Ac + ATP.

On pourra donc établir le double bilan :

$$\text{Glc} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow CO_2 + \text{Lac} + \text{Eth} + \text{ATP}$$

ou

$$\text{Rib} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \rightarrow \text{Lac} + \text{Ac} + 2\ \text{ATP}.$$

La dénomination « fermentation hétérolactique » s'explique par la présence d'autres composés à côté de l'acide lactique. Cette fermentation est le plus souvent nocive, provoquant des altérations des jus de fruit, de la bière, du vin, etc. Mais elle est mise en jeu au cours de la production du kéfir au Moyen-Orient, qui est une boisson gazeuse crémeuse, épaisse, contenant des « grains » constitués de polysaccharides (kéfirane), de caséine coagulée par l'acide lactique présent et de micro-organismes. La stabilité des « grains » de kéfir dépend de la symbiose entre des levures *(S. cerevisiae, S. unisporus, S. kefyr, Ca. kefyr, Ca. valida…)*, représentant de 5 à 10 % de la culture, des bactéries lactiques *(Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus)* et des streptocoques.

• **Voie d'Entner-Doudoroff**. Découverte par ces deux chercheurs en 1952 chez les *Pseudomonas*, elle se rencontre aussi chez d'autres espèces *(Azotobacter, Xanthomonas*, certains *Streptococcus)*. Au Mexique, la fermentation alcoolique du jus d'agave se fait avec l'intervention de *Zymomonas mobilis* pour donner le pulque (qui ressemble à un cidre mousseux) et la tequila ; en Afrique, c'est le vin de palme qui est fabriqué de cette manière. Cette voie est caractérisée par *(fig. IV.15 et IV.17)* :

– une **activation** du glucose (a) ;

– une **oxydation** du glucose-phosphate (b) ;

– l'obtention d'un composé « clé », le KDPG (c) ou 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (d'où l'appellation voie du KDPG donnée quelquefois à cette voie) ;

– une enzyme « clé », la **KDPG aldolase** (d) ;

– une partie **commune** avec la voie d'Emden-Meyerhof (e).

Le bilan est le suivant :

$$\text{Glc} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ \text{Eth} + 1\ \text{ATP}.$$

4.1.1.4. Dégradation aérobie du glucose

La plupart des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies sont capables de dégrader le glucose en présence d'oxygène jusqu'au stade CO_2 et H_2O.

Copyrighted material

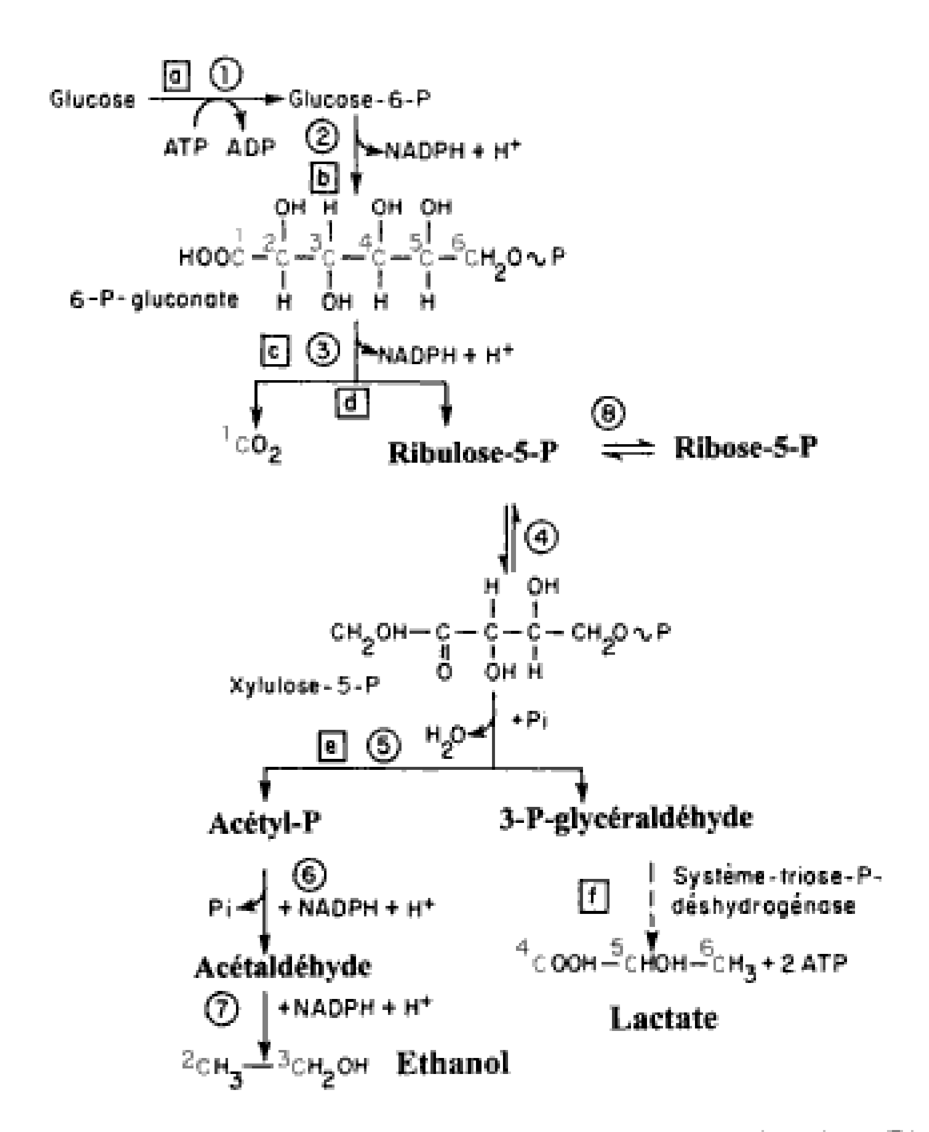


Figure IV.16 – **Fermentation hétérolactique du glucose par la voie des pentoses-phosphate (Dickens-Horecker).**

① Hexokinase.
② Glucose-6P déshydrogénase.
③ P-Gluconate déshydrogénase.
④ Ribulose-P-épimérase.
⑤ Pentulose-P cétolase.
⑥ Acétaldéhyde déshydrogénase.
⑦ Alcool déshydrogénase.
⑧ Ribose-P isomérase.

• **Glycolyse et oxydation complète du glucose : cycle de Krebs.** Le cycle tricarboxylique de Krebs *(fig. IV.18)* assure, chez les micro-organismes aérobies comme chez les organismes supérieurs, l'oxydation complète du glucose. Il n'intervient pas uniquement dans le métabolisme glucidique, car l'acétate qui va subir une oxydation totale peut provenir non seulement de la glycolyse, mais aussi de l'oxydation (β-oxydation) des acides gras ou des acides aminés. Ainsi, en un tour de cycle, 1 molécule d'acétate est dégradée en 2 molécules de CO_2, 8 H sous forme de 2 $NADH^+$, 1 $NADPH^+$ et 1 $FADH_2$. En plus de son rôle de dégradation et de production d'énergie, le cycle de Krebs constitue le point de départ de la synthèse de nombreux métabolites essentiels.

• **Bilan énergétique de la dégradation aérobie du glucose.** Le bilan énergétique peut être établi soit en moles de protons expulsés soit en **moles d'ATP** produites. Il faut cependant avoir présent à l'esprit le fait que tous les protons du gradient électrochimique ne donnent pas forcément de l'ATP, d'autres fonctions cellulaires utilisent directement ce gradient sans passer par l'ATP (transport, mobilité). De ce fait, un bilan exprimé en protons est plus judicieux à la fois pour calculer le rendement énergétique et pour comparer différentes voies de dégradation (respiration, shunt, fermentation, etc.), ainsi que pour comparer les rendements énergétiques de différents micro-organismes entre eux. De plus, il subsiste toujours une incertitude sur le nombre de moles d'ATP formés à partir d'une mole de protons. Chez *E. coli*, la glycolyse nous fournit (si l'on prend comme hypothèse une utilisation de 3 H^+ pour 1 ATP) *(tab. IV.1)*.

Au total, il y a donc l'équivalent de 56 H^+, soit $56 \times 18 = 1\,008$ $kJ \cdot mole^{-1}$ de glucose ; la libération d'énergie provenant de l'oxydation complète du glucose étant de 2 875 $kJ \cdot mole^{-1}$, le rendement obtenu par ces transformations biologiques est de $(1\,008/2\,875) \times 100$, soit environ 35 %.

Copyrighted mater

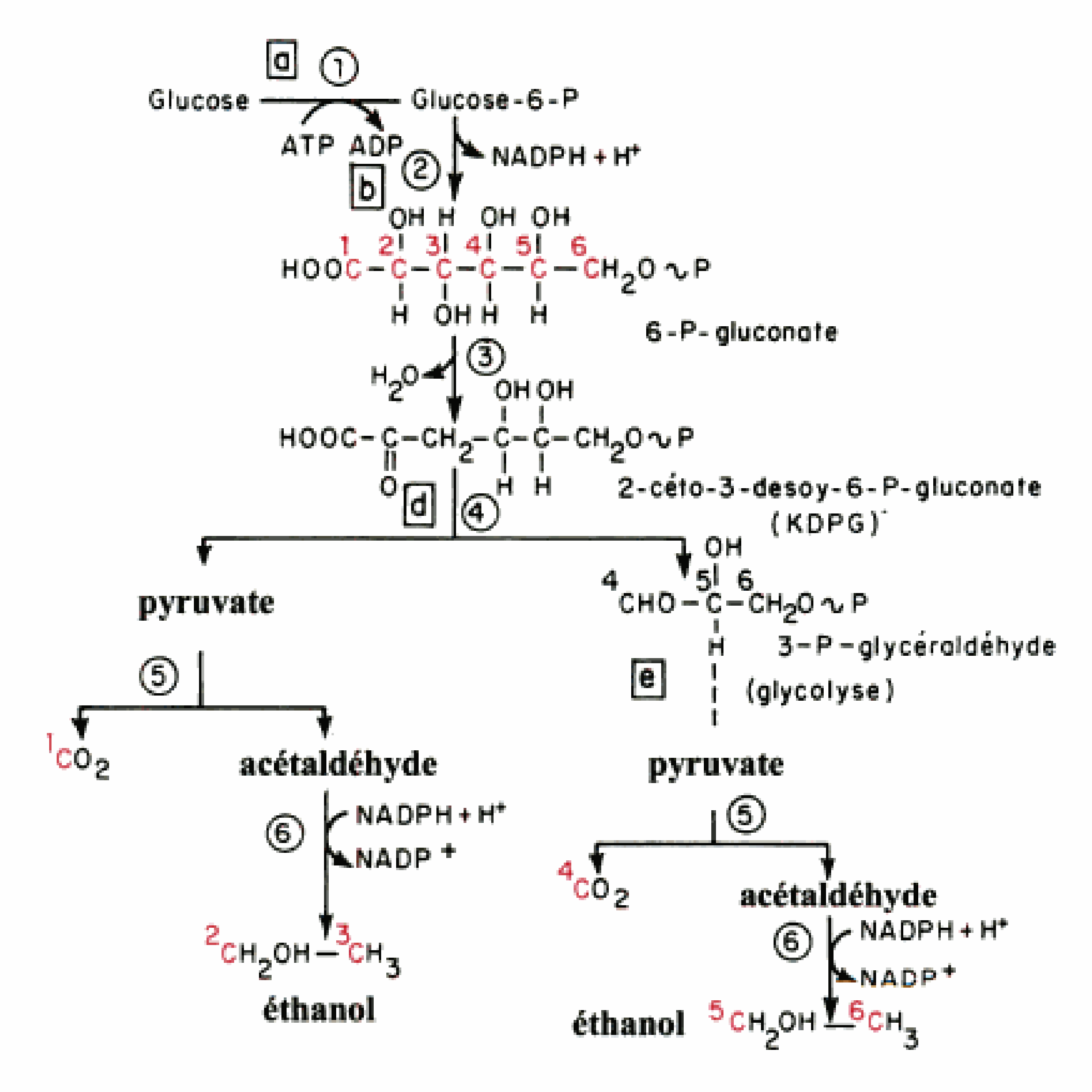


Figure IV.17 – Fermentation du glucose par la voie d'Entner-Doudoroff (*Zymomonas mobilis*).

① Hexokinase. ② Glucose-6P déshydrogénase. ③ P-Gluconate P-déhydrase. ④ KDPG Aldolase. ⑤ Pyruvate décarboxylase. ⑥ Alcool déshydrogénase.

Tableau IV.1 –

Réactions lors de la glycolyse		Équivalent au protons H^+	Réactions lors du cycle de krebs :		Équivalent au protons H^+
Transphosphorylation du glucose	– 1 ATP	– 3	Oxydation de 2 pyruvates	+ 2 NADH + H^+	+ 8
Transphosphorylation du fructose-6P	– 1 ATP	– 3	Oxydation de 2 isocitrates Oxydation de 2 isocitrates	+ 2 NADH + H^+ + 2 $FADH_2$	+ 8 + 4
Transphosphorylation du 1-3 diphosphoglycérate (2 moles)	+ 2 ATP	+ 6	Oxydation de 2 α-cétoglutarates	+ 2 NADH + H^+	+ 8
Transphosphorylation du PEP (2 moles) :	+ 2 ATP	+ 6	Oxydation de 2 malates	+ 2 NADH + H^+	+ 8
Oxydation du 3P-glycéraldehyde	+ 2 NADH + H^+	+ 8	Désacylation de 2 succinyl-CoA	+ 2 GTP	+ 6

Copyrighted material

Chez *P. denitrificans*, la même dégradation se solde par un bilan différent du fait de la production de 3 paires de protons par NADH oxydé (on prend comme hypothèse 3 H^+ pour 1 ATP).

Réactions lors de la glycolyse		Équivalent en protons H^+
Transphosphorylation du glucose	– 1 ATP	– 3
Transphosphorylation du fructose-6P	– 1 ATP	– 3
Transphosphorylation du 1-3 diphosphoglycérate (2 moles)	+ 2 ATP	+ 6
Transphosphorylation du PEP (2 moles)	+ 2 ATP	+ 6
Oxydation du 3P-glycéraldehyde	+ 2 NADH + H^+	+ 12
Réactions lors du cycle de Krebs :		
Oxydation de 2 pyruvates	+ 2 NADH + H^+	+ 12
Oxydation de 2 isocitrates	+ 2 NADH + H^+	+ 12
Oxydation de 2 succinates	+ 2 $FADH_2$	+ 8
Oxydation de 2 α-cétoglutarates	+ 2 NADH + H^+	+ 12
Oxydation de 2 malates	+ 2 NADH + H^+	+ 12
Désacylation de 2 succinyl-CoA	+ 2 GTP	+ 6

Au total, il y a donc l'équivalent de 80 H^+, soit 80 × 18 = 1 440 kJ·$mole^{-1}$ de glucose ; le rendement obtenu est de (1 440/2 875) × 100, soit environ 50 %.

Ces rendements sont à comparer avec celui des fermentations (de 1 à 3 %).

• **Shunt de l'hexose monophosphate**. Cette voie, dite de Warburg-Dickens Horecker, emprunte le tronc commun précédent qui conduit du glucose au 6-P-gluconate. Puis elle poursuit les mêmes étapes que la fermentation hétérolactique jusqu'au xylulose 5-P. C'est à ce niveau que se situent les divergences. Cet intermédiaire subit en effet une série d'interconversions catalysées par la transcétolase et la transaldolase. Pour chaque mole de triose-P, 3 moles de CO_2 et 6 moles de NADPH sont obtenues. L'ensemble des étapes est schématisé sur la *figure IV.19*.

Du point de vue énergétique, l'oxydation des 12 moles de NADPH fournit 48 H^+ (soit de 16 à 24 ATP) chez les bactéries ayant 2 sites de production d'H^+ (comme *E. coli*) et 72 H^+ (soit de 24 à 36 ATP) chez celles qui en ont 3. Ce cycle, qui peut être suivi par un grand nombre d'espèces de bactéries *(Acetobacter, Pseudomonas, E. coli)*, de levures *(Torula)*, de moisissures *(Aspergillus)*, est caractérisé par la production de NADPH + H^+ nécessaire aux biosynthèses. Il donne aussi naissance à de nombreux hexoses et pentoses. Par cette production de pentoses, cette voie est à la base des synthèses d'acides nucléiques, d'acides aminés aromatiques et de nombreuses vitamines.

4.1.2. Catabolisme des disaccharides

Les disaccharides subissent de la part des micro-organismes une action d'hydrolyse. Les enzymes responsables sont presque toujours des enzymes induites et très spécifiques de la forme de la liaison glycosidique (α ou β). Elles peuvent également dégrader des analogues de substrat qui possèdent la même liaison glycosidique (ONPG à la place du lactose). Grâce à cette propriété, on peut mettre en évidence les enzymes en ayant recours à des substrats chromogènes ou libérant un produit chromogène après hydrolyse. Elles seront recherchées sur les germes après culture sur les substrats spécifiques :

- lactose pour la **β-galactosidase** ;
- maltose pour la **maltase** ;
- saccharose pour l'**invertase**.

L'action des enzymes libère les oses constitutifs. Le glucose subira l'une des voies métaboliques définies précédemment. Le fructose, qui provient du saccharose, est transformé par phosphorylation en fructose phosphate qui rentre ensuite dans le cycle d'Embden-Meyerhof. Le galactose, qui provient du lactose, sera épimérisé en glucose en trois étapes (UDP : uridine diphosphate, Gal : galactose) :

$$\text{Gal + ATP} \xrightarrow{\text{Gal-kinase}} \text{Gal 1-P + ADP}$$

$$\text{Gal 1-P + UDP-Glc} \xrightarrow{\text{Transférase}} \text{UDP-Gal + Glc 1-P}$$

$$\text{UDP-Gal} \xrightarrow{\text{Épimérase}} \text{UDP-Glc}$$

Le bilan global s'établit comme suit :

$$\text{Gal + ATP} \rightarrow \text{Glc 1-P + ADP.}$$

Le galactose peut aussi être oxydé et utilisé par une voie analogue à celle d'Entner-Doudoroff.

Les disaccharides font l'objet d'un large emploi industriel : le maltose dans l'industrie de la bière, le saccharose pour la pâtisserie, la confiserie, etc.,

Copyrighted material

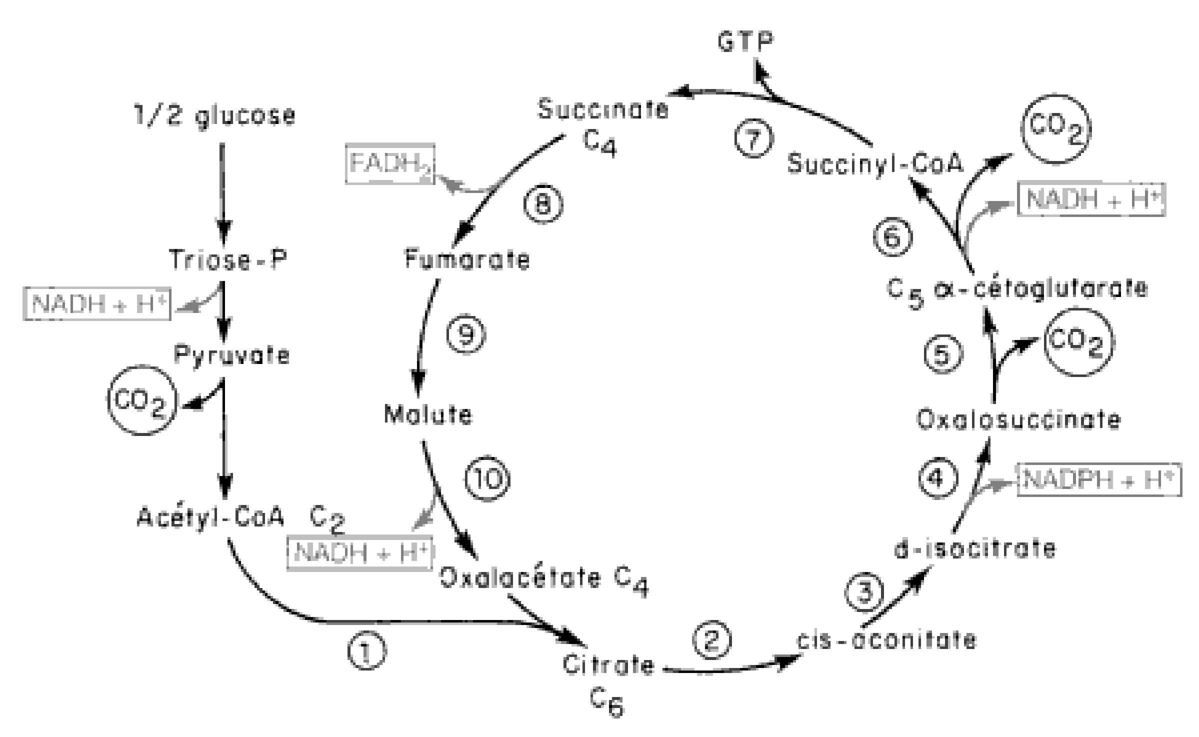


Figure IV.18 – **Cycle tricarboxylique de Krebs.**

① Citrate synthétase.
② ③ Aconitase.
④ ⑤ Isocitrate déshydrogénase.
⑥ Cétoglutarate déshydrogénase.
⑦ Succinate thiokinase.
⑧ Succinate déshydrogénase.
⑨ Fumarase.
⑩ Malicodéshydrogénase.

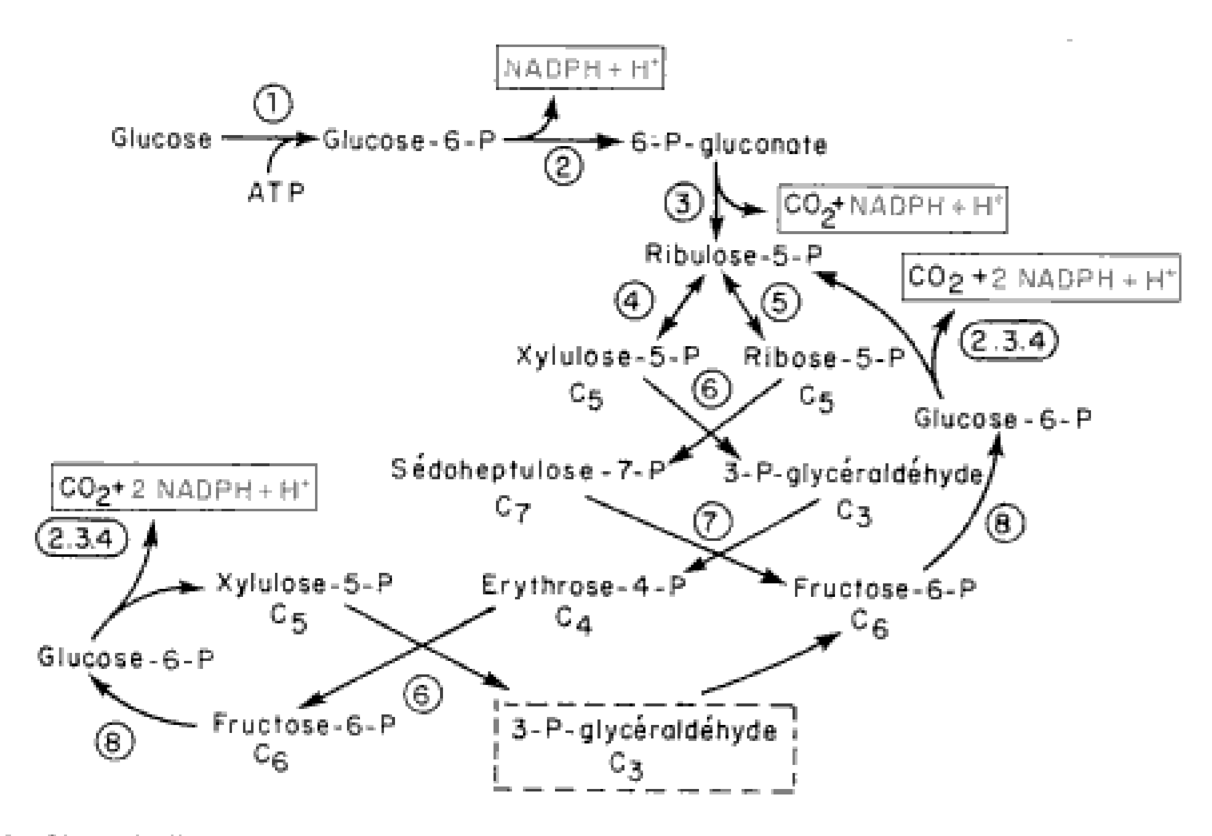


Figure IV.19 – **Shunt de l'hexose monophosphate.**

① Hexokinase.
② Glucose-6-P déshydrogénase.
③ Gluconate-P déshydrase.
④ Ribulose-P-épimérase.
⑤ Ribose-P isomérase.
⑥ Transcétolase.
⑦ Transalodolase.
⑧ P-Hexo-isomérase.

Copyrighted material

et pour la fermentation (alcool de betterave), le lactose dans les laiteries et les fromageries.

Le lactose est un constituant de nombreux milieux de culture d'un usage courant en microbiologie médicale et, surtout, en microbiologie alimentaire. Les bactéries qui fermentent le lactose (coliformes, *E. coli*) sont des germes tests de contamination fécale et sont donc recherchées en tant que telles pour évaluer la qualité sanitaire des produits alimentaires. La recherche de la β-galactosidase est un test de grande utilité diagnostique.

4.1.3. Catabolisme des polysaccharides

Les polysaccharides sont très nombreux et variés dans la nature et de nombreux micro-organismes se sont spécialisés dans leur dégradation. Deux polysaccharides méritent une attention particulière.

4.1.3.1. Amidon

Ce polyglucose renferme deux constituants : l'amylose (20 %), ou poly-α (1-4)-D-glucopyranoside, et l'amylopectine (80 % de la masse totale), de structure ramifiée et comportant des chaînes latérales branchées par liaison α (1-6) tous les 20 résidus glucose environ.

Les amylases microbiennes qui dégradent l'amidon sont des exoenzymes. On distingue :

– les **α-amylases** qui scindent la molécule en n'importe quel point (endoamylases) au niveau des liaisons α (1-4). Leur activité donne naissance à du maltose, du maltotriose et des dextrines ;

– les **β-amylases** qui ont le même mode d'action mais qui coupent la molécule à partir de son extrémité non réductrice seulement (exoamylases). On obtient du maltose et des dextrines de poids moléculaire élevé ;

– les **γ-amylases** (glucamylases) sont exclusivement bactériennes ; elles attaquent par l'extrémité non réductrice aussi bien les liaisons α (1-4) que les liaisons α (1-6) en libérant du glucose.

Les amylases sont rencontrées surtout chez les *Bacillus*, les *Clostridium* et les *Aspergillus*. Au laboratoire, leur mise en évidence est un critère d'identification.

Le saké japonais est le produit de la dégradation de l'amidon du riz par l'α-amylase d'*A. orizeae* puis d'une fermentation alcoolique par *Sc. cerevisiae*.

4.1.3.2. Cellulose

Ce poly-β (1-4)-D-glucopyranose, constituant principal des plantes, se retrouve dans les débris végétaux (sol, sédiments) et dans le tube digestif des herbivores.

Les organismes **cellulolytiques** sont très variés : *Bacillus, Clostridium, Cellulomonas, Pseudomonas,* moisissures, etc. Dans le milieu naturel, ce sont les agents de dégradation des fibres textiles cellulosiques (coton, jute). Leur importance est primordiale dans la nutrition des herbivores (bovins) qui ne possèdent pas de cellulases propres et ne pourraient donc digérer que très partiellement l'herbe qu'ils mangent sans eux. Les bactéries cellulolytiques du rumen ou de l'intestin effectuent ce travail de digestion, ce qui permettra à l'animal d'absorber les produits de la dégradation de la cellulose (glucose, maltose) et les cellules bactériennes La vache peut être qualifiée en fait de « carnivore » qui se nourrit de protéines bactériennes, son rumen constituant une véritable étuve (37 °C) assurant la croissance des bactéries cellulolytiques à partir de l'herbe ingérée. La cellulose provenant des résidus de paille, de paille de riz et des déchets de maïs peut être hydrolysée par différentes espèces fongiques *(Trichoderma harzianum, Pe. janthinellum, Chaetomium cellulolyticum).*

4.1.3.3. Autres polysaccharides ou dérivés

On peut citer :

– la pectine dont la dégradation est recherchée dans le rouissage de fibres textiles (chanvre) ;

– la chitine provenant des carapaces des crustacés ou de la paroi des champignons ;

– les chrondroïtines sulfates du cartilage ;

– l'acide hyaluronique ;

– l'agar-agar, etc.

Tous ces composés sont dégradables par certaines espèces microbiennes, même l'agar qui est pourtant utilisé pour la gélification des milieux du fait de sa stabilité.

Copyrighted material

4.1.4. Catabolisme des dérivés des sucres

Les dérivés des sucres comme les acides et les alcools sont dégradables par les micro-organismes. Ces composés sont utilisés dans des milieux de culture en vue de l'identification des bactéries au laboratoire. Cette dégradation conduit le plus souvent au stade du sucre correspondant. On peut mentionner :

– les **hexitols** tels le mannitol, le dulcitol, qui donnent naissance respectivement au mannose, au galactose et au sorbose ;

– les **méthylhexoses** comme le rhamnose donnant du mannose ;

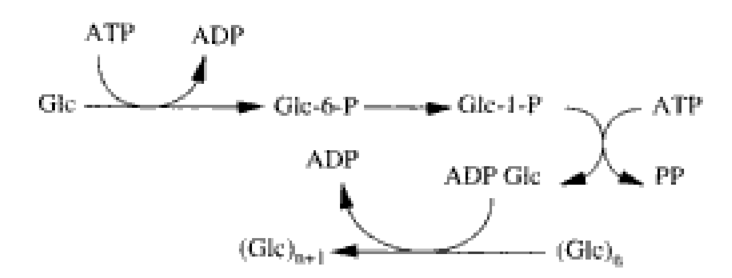
– les **hétérosucres** comme l'esculine, qui est le glucoside de l'esculétine (6,7-dihydroxycoumarine + glucose), et la salicine, qui est le glucoside de la saligénine (alcool salicylique + glucose).

4.2. Anabolisme

L'anabolisme des glucides procède de voies générales classiquement décrites dans les livres de biochimie. Quelques cas particuliers qui peuvent faire l'objet d'expériences de laboratoire seront brièvement rapportés.

4.2.1. Synthèse du glycogène

Lorsqu'une bactérie est limitée dans son développement pour une cause autre que la source d'énergie et de carbone, elle peut accumuler du glycogène à condition de posséder le système enzymatique qui permet la polymérisation du glucose en glycogène ; cette synthèse se fait suivant le schéma suivant :



Le glycogène s'accumule sous forme de granulations intracytoplasmiques que l'on peut mettre en évidence par coloration (à l'iode par exemple).

4.2.2. Synthèse de lévanes et de dextranes

Les lévanes [poly-β (2-6)-fructose] et les dextranes [poly-α (1-6)-glucose avec ramification α (1-3) ou α (1-4)] sont synthétisés à partir du saccharose selon→ les réactions suivantes :

$$\text{n-saccharose} \rightarrow \text{n-glucose} + (\text{fructose})_n$$
$$\text{n-saccharose} \rightarrow (\text{glucose})_n + \text{n-fructose.}$$

Ces composés sont responsables de l'aspect mucilagineux des cultures sur milieu saccharosé. Certaines capsules bactériennes sont également de nature polyosidique (voir chap. II). L'utilité biologique de ces composés est considérable, en particulier lors de la formation de l'humus dans le sol.

5. Métabolisme des protéines

5.1. Catabolisme

Les protéines sont des composés de poids moléculaire élevé comprenant des acides aminés de vingt types différents enchaînés les uns aux autres par liaisons peptidiques. La dégradation des protéines implique la destruction de cet arrangement.

Les micro-organismes protéolytiques sont les agents de la putréfaction et doivent leur activité à la sécrétion de protéinases exocellulaires. On trouve dans ce groupe des moisissures, de nombreuses bactéries aérobies strictes *(Pseudomonas, Bacillus)*, des anaérobies facultatives *(Proteus, Serratia)* et des anaérobies strictes sporulées (*Cl. histolyticum* en particulier).

Copyrighted material

5.1.1. Protéinases ou protéases

La première enzyme qui intervient pour dégrader la protéine est la protéinase qui coupe la macromolécule en composants de petite taille. On distingue les exopeptidases qui hydrolysent les protéines en partant d'une extrémité soit C terminale, soit N terminale et les endopeptidases (protéinases proprement dites) qui coupent les liaisons situées à l'intérieur de la chaîne peptidique. Les germes de la putréfaction produisent généralement plusieurs protéinases exocellulaires ; *Cl. histolyticum* élabore quatre types de protéinases. *B. subtilis* et les autres *Bacillus* excrètent jusqu'à 1 $g.L^{-1}$ de milieu de protéinases qui pourront être isolées et utilisées industriellement. Les protéinases des moisissures contribuent à l'élaboration de différents produits alimentaires tel le fromage de roquefort par *Pe. roquefortii*. En dehors des protéinases exocellulaires, toutes les bactéries contiennent des protéinases endocellulaires, ou cathepsines, qui ne sont actives qu'au cours de la phase stationnaire et de déclin de la croissance et qui sont responsables de l'autolyse.

La gélatinase est recherchée dans un but diagnostique pour classer les espèces (*Bacillus*, entérobactéries), D'autres protéinases, causes d'altérations, sont recherchées lors de la dégradation de produits comme le lait (caséinase) *(fig. IV.20)*, le sérum, le blanc d'œuf, etc.

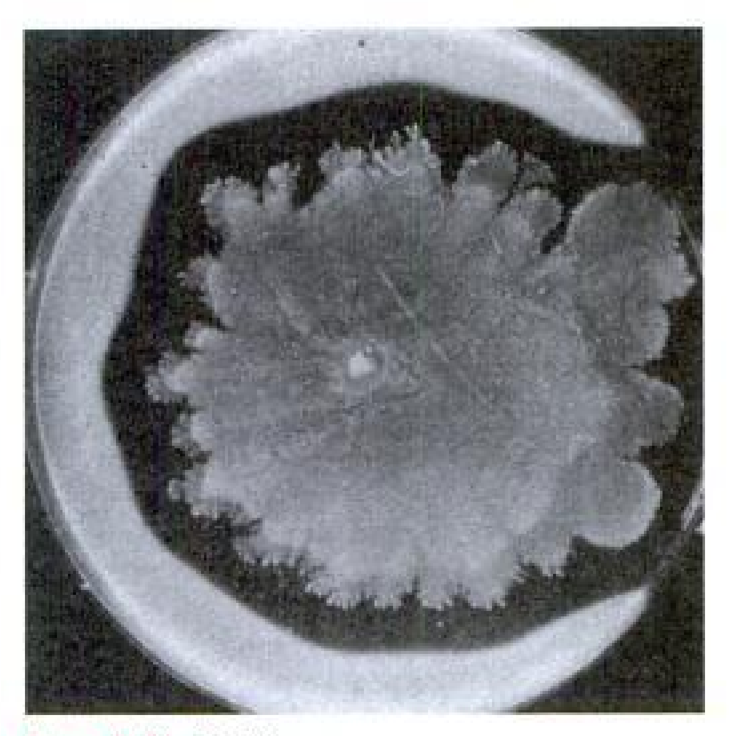


Figure IV.20 – **Protéinases.**
Hydrolyse de la caséine chez un *Bacillus*.

5.1.2. Peptidases

L'action des protéinases sur les protéines conduit à un mélange d'acides aminés et de polypeptides. Ceux-ci sont dégradés en acides aminés par des peptidases. Ces enzymes, très courantes chez les micro-organismes, ne sont pas habituellement recherchées dans un but diagnostique.

5.1.3. Dégradation des acides aminés

La dégradation des acides aminés est très fréquemment opérée par les bactéries à Gram négatif et parfois par les autres. Les enzymes responsables sont le plus souvent soumises à un système de régulation. Les conditions expérimentales doivent être parfaitement définies :

– le **pH du milieu** : les décarboxylases sont synthétisées en milieu acide, les désaminases plutôt en milieu basique ;

– la **composition du milieu** : la présence de sucre fermentescible à faible dose favorise la synthèse de décarboxylases (pH acide) mais, à forte concentration, elle couvre les besoins énergétiques et limite l'utilisation des protéines ;

– la **pression partielle en oxygène** : l'oxygène est indispensable pour la désamination oxydative (LDA, TDA, etc.), mais il peut inhiber les désaminations non oxydatives (aspartases).

La dégradation des acides aminés s'effectue habituellement par désamination ou décarboxylation ou encore transamination, d'intérêt diagnostique mineur à quelques exceptions près, et, contrairement à la dégradation des glucides, les réactions de dégradation des acides aminés ne produisent pas d'énergie stockée sous forme d'ATP, l'énergie des liaisons rompues étant perdue sous forme de chaleur. Seule une dégradation des radicaux carbones restants peut produire de l'énergie utilisable par la cellule.

5.1.3.1. Désaminations

Elles conduisent à la libération du groupe NH_2 le plus souvent sous forme d'ammoniaque. Les

Copyrighted material

plus connues sont les désaminations oxydatives. La lysine désaminase (LDA), la tryptophane désaminase (TDA) et la phénylalanine désaminase sont les plus recherchées dans un but diagnostique.

• **Désamination oxydative**. Elle conduit à la formation intermédiaire d'un acide aminé qui est ensuite hydrolysé en ammoniaque et en acide α-cétonique selon la réaction :

$$R - CH2 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH + 1/2\,O_2$$

$$\rightarrow R - CH_2 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - COOH + NH_3$$

En général, les α-cétoacides réagissent avec des sels de fer pour donner un complexe coloré spécifique qui permet de caractériser l'enzyme qui a été à l'origine de leur production (TDA : couleur brune sur milieu urée-indole ; LDA : couleur rouge bourgogne sur milieu lysine-fer).

Deux types d'enzymes catalysent cette désamination :

– les amino-acides oxydases flavoprotéiniques, auto-oxydables, qui forment donc H_2O_2 (décomposé par la catalase ou une peroxydase) ;

– les amino-acides déshydrogénases à pyridine nucléotide connus pour l'oxydation de l'acide glutamique, l'alanine (chez *B. subtilis*) et la phénylalanine (chez *Proteus*).

• **Désamination désaturante**. Elle conduit à la formation de NH_3 et d'un acide désaturé. Par exemple, l'acide aspartique est transformé en acide fumarique par *E. coli*, *Ps. fluorescens*, etc., grâce à une aspartase :

$$HOOC - \overset{\overset{CH_2 - COOH}{|}}{CH} - NH_2 \Leftrightarrow \begin{matrix} CH - COOH \\ \| \\ HC - COOH \end{matrix} + NH_3$$

• **Désamination réductrice**. Elle donne naissance à des acides gras saturés et de l'ammoniac selon la réaction :

$$R - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH \overset{+2H^+}{\Leftrightarrow} R - CH_2 - COOH + NH_3$$

Cette réaction s'effectue en anaérobiose ; on la rencontre en général chez les *Clostridium*.

• **Désamination couplée**. Encore connue sous le nom de réaction de Stickland, elle n'est trouvée que chez les procaryotes. C'est une réaction d'oxydoréduction couplée entre deux acides aminés, l'un jouant le rôle de donneur d'électron, l'autre d'accepteur. Dans la plupart des cas, le cétoacide formé est décarboxylé. Par exemple, la fermentation de l'alanine et de la glycine par *Cl. sporogenes :*

1 Ala + 2 Gly → 3 acétates + 3 NH_3 + CO_2.

Sur le plan énergétique, il y a formation d'un ATP au cours de la décarboxylation de l'acide pyruvique.

• **Désamination par déshydratation**. Ce mode de désamination est particulier aux acides aminés hydroxylés et est exclusivement microbien. Il y a formation de NH_3 et d'un acide cétonique. Par exemple, *E. coli* possède une sérine désaminase qui catalyse la réaction :

$$HOOC - \overset{\overset{CH_2OH}{|}}{CH} - NH_2 \overset{H_2O}{\rightarrow} HOOC - \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} = NH \Leftrightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CO = NH_3 \\ | \\ COOH \end{matrix}$$

• **Désamination après transamination**. Chez les *Clostridium* qui n'effectuent pas la réaction de Stickland, on peut rencontrer le mécanisme suivant qui consiste en une transamination sur acide -cétoglutarique, suivi d'une désamination de l'acide glutamique formé par la glutamate déshydrogénase.

5.1.3.2. *Décarboxylases*

La décarboxylation des acides aminés libère le groupe carboxyl sous forme de CO_2 et une amine :

$$R - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH \rightarrow R - CH_2 - NH_2 + CO_2$$

Ces décarboxylases sont induites à un pH acide. Les aminés formés ont un pouvoir toxique et des propriétés pharmacodynamiques observées lors des infections :

– la **lysine décarboxylase** (LDC) transforme la lysine en cadavérine (aux propriétés anémiantes) ;

– l'**ornithine décarboxylase** (ODC) produit de la putrescéine (au pouvoir parasympathicomimétique) ;

– l'**histidine décarboxylase** (HDC) conduit à l'histamine, responsable de phénomènes de sensibilisation, voire de choc.

Copyrighted material

La recherche de la LDC et de l'ODC présente un intérêt diagnostique.

5.1.3.3. Cas particuliers

• **Tryptophane**. Outre la désamination par la **TDA**, le tryptophane peut être dégradé en indole, par exemple chez *E. coli* :

$$\text{Try} \rightarrow \text{indole} + \text{Pyr} + NH_3.$$

L'indole peut être mis en évidence par la réaction d'Ehrlich-Kowacs. En anaérobiose, l'indole est souvent transformé à son tour en scatol (odeur nauséabonde des matières en décomposition).

• **Acides aminés soufrés**. La cystéine, la cystine et la méthionine peuvent être dégradées par les voies précédentes (désamination ou décarboxylation) pour donner des mercaptans (R-SH). Un autre processus peut être suivi grâce aux désulfurases qui libèrent de l'H_2S (mis en évidence par des sels de fer ou de plomb sous forme de sulfure noir). Pour que cette réaction soit spécifique, il faut éviter de prendre un milieu contenant une source de soufre autre que les acides aminés.

• **Urée**. L'uréase est une enzyme très répandue dans le monde microbien ; elle est surtout synthétisée en milieu basique. Les *Proteus, Klebsiella* et *Yersinia* sont des exemples bien connus de bactéries uréolytiques.

Le changement de pH peut être facilement mis en évidence à l'aide d'un indicateur.

$$CO(NH_2)_2 \xrightarrow{\text{uréase}} CO_2 + NH_3 \xrightarrow{+H_2O} CO_3(NH_4)_2$$

• **Arginine**. L'arginine est dégradée en produits basiques par diverses voies dont quatre principales : arginase, arginine désimidase, arginine transaminidase et arginine décarboxylase. Seule la première de ces voies a un intérêt taxonomique, elle est en effet connue sous le nom de système ADH (arginine dihydrolase), système qui compte trois réactions successives :

$$\text{arginine} + H_2O \xrightarrow{\text{arginine-désimidase}} \text{citrulline} + NH_3$$

$$\text{citrulline} + H_3PO_4 \xrightarrow{\text{ornithine-transcarbamylase}} \text{ornithine} + \text{carbamylphosphate}$$

$$\text{carbamylphosphate} + ADP + H_2O \xrightarrow{\text{carbamate-kinase}} ATP + NH_3 + CO_2$$

Le bilan est donc :

$$\text{arginine} + 2\,H_2O + H_3PO_4 + ADP \rightarrow ATP + \text{ornithine} + 2\,NH_3 + CO_2,$$

d'où le nom ADH (l'arginine est présente chez de nombreux *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Clostridium*). Il faut noter que cette réaction est **productrice d'énergie** grâce à une phosphorylation liée au substrat.

5.2. Anabolisme ou biosynthèse

La biosynthèse des protéines est un problème d'ordre génétique et biochimique. Elle repose sur ce que Crick a appelé le dogme fondamental de la génétique moléculaire selon lequel l'information génétique se transmet de l'ADN à l'ARN, puis de l'ARN aux protéines En fait, de plus récents travaux modifient quelque peu cette affirmation qui prendrait la forme :

$$\text{ADN} \leftrightarrow \text{ARN} \rightarrow \text{protéine.}$$

Le dogme fondamental définit trois processus principaux dans la conservation et la transmission de l'information génétique. Le premier processus est **la réplication** qui donne naissance à une copie d'ADN identique à la molécule parentale. Le second est la **transcription** par laquelle le message génétique de l'ADN est transcrit sous forme d'ARN puis transporté au niveau des ribosomes. Le troisième est la **traduction** qui permet de traduire l'information génétique dans l'alphabet à 20 lettres de la structure protéique *(fig. IV.21)*. Le code génétique *(fig. IV.22)*, qui a permis de décrypter les séquences nucléotidiques, a été établi. Le phénomène de la réplication ayant été analysé précédemment, l'étude de la transcription et de la traduction fait partie du cours de biochimie auquel on se référera, seul sera envisagé ici ce qui concerne plus particulièrement les phénomènes de régulation chez les bactéries.

5.2.1. Régulation de la biosynthèse des protéines

La cellule d'*E. coli* porte sur son génome environ 3 000 à 4 000 gènes codant pour la synthèse de 3 000 à 4 000 protéines distinctes. On pourrait s'attendre à rencontrer dans cette cellule un nombre équivalent de copies de chaque protéine.

Copyrighted material

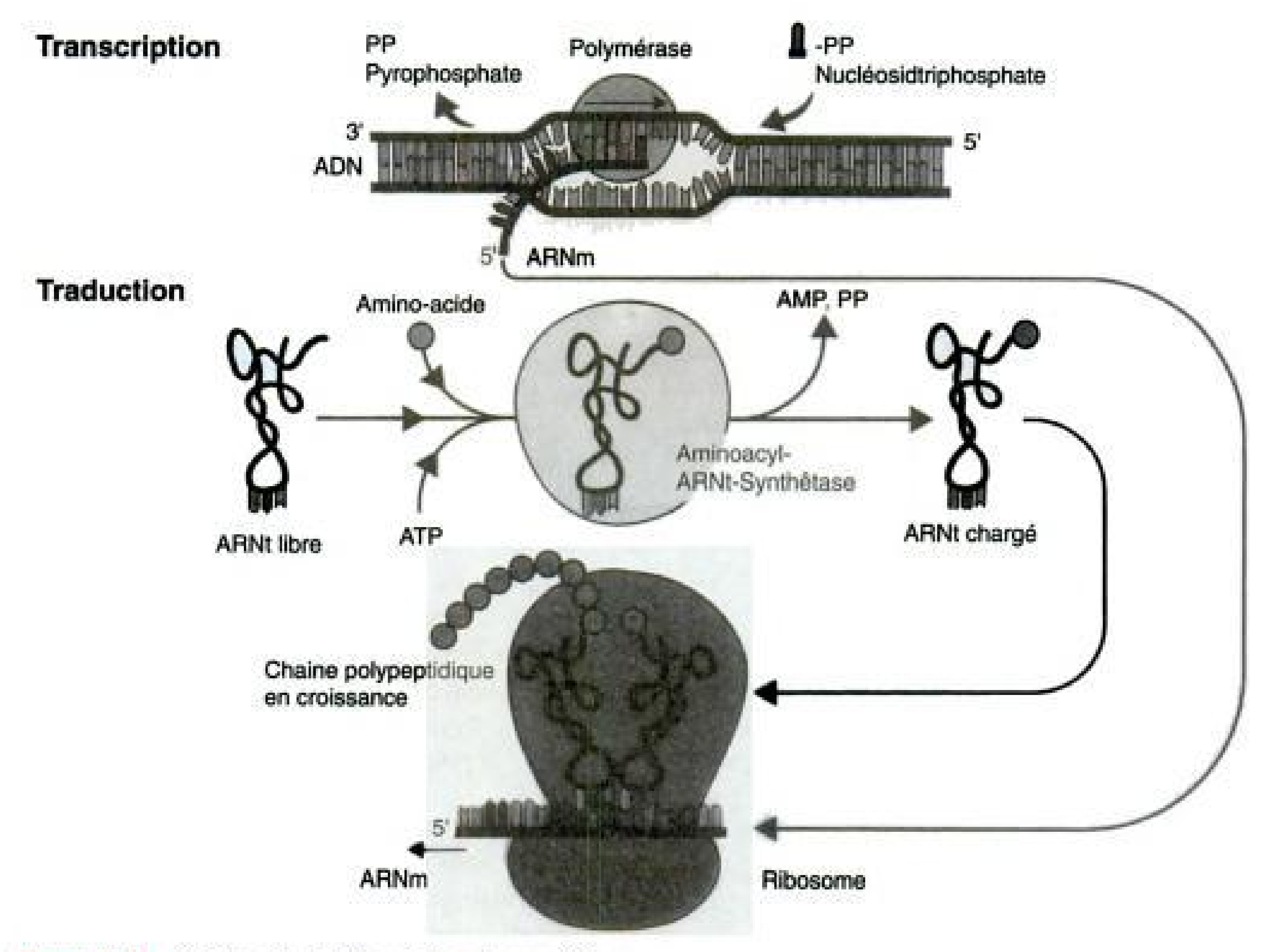


Figure IV.21 – **Schéma de la biosynthèse des protéines.**

La réalité est totalement différente. Ainsi, les copies de certaines enzymes de la glycolyse existent à plus de 100 000 exemplaires tandis que celles de la β-galactosidase ne sont représentées qu'à quelques unités seulement. Il existe donc un contrôle, une régulation permettant à la cellule de posséder les différentes enzymes nécessaires à son métabolisme de base et d'économiser celles dont les fonctions ne sont pas indispensables.

Les travaux de Jacob et Monod, qui leur ont valu le prix Nobel de médecine en 1965, sont à la base de ce que l'on connaît actuellement sur la régulation génétique.

La connaissance des mécanismes de régulation permet, au niveau industriel, de travailler dans des conditions optimales de production et, le cas échéant, de « déréguler » une voie par des moyens génétiques afin d'obtenir un métabolite en grande quantité.

5.2.2. Facteurs de régulation

5.2.2.1. Enzymes constitutives

Les **enzymes constitutives** font partie du pool normal et permanent de la cellule. Elles sont formées à des vitesses et des taux constants, quelle que soit l'activité métabolique de la cellule. Telles sont les enzymes de la glycolyse qui assurent la production d'énergie dans la cellule.

5.2.2.2. Enzymes inductibles

Les **enzymes adaptatives** ou **inductibles** ne sont normalement présentes qu'à l'état de traces dans les bactéries, mais leur synthèse est amplifiée considérablement en présence de leur substrat.

La β-galactosidase est un exemple classique d'enzyme inductible qui a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Une souche sauvage d'*E. coli*, cultivée en présence de glucose, ne synthétise pas de β-galactosidase. Dans un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone, elle produit l'enzyme massivement (plus de 5 000 molécules par cellule). Dans le cas présent, c'est le lactose, le substrat, qui joue un rôle d'**inducteur**.

5.2.2.3. Répression enzymatique

Le processus de répression enzymatique est opposé à celui d'induction enzymatique. Lorsque l'on cultive des *E. coli* sur un milieu synthétique contenant un sel d'ammonium comme

Copyrighted material

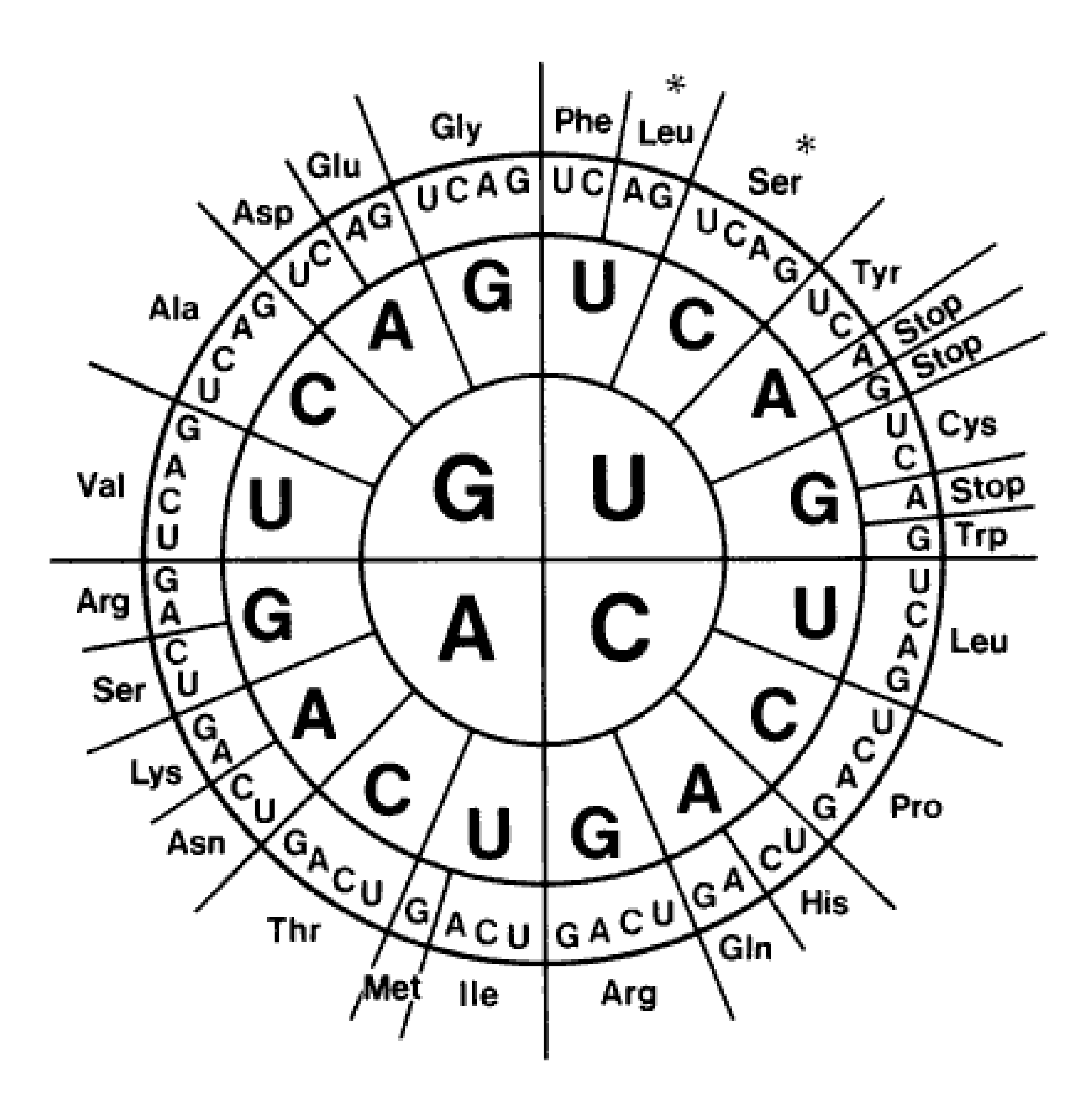


Figure IV.22 – **Le code génétique : le code se lit de l'intérieur vers l'extérieur.**

seule source d'azote, les bactéries doivent posséder toutes les enzymes nécessaires à la synthèse des 20 acides aminés constitutifs des protéines. Cependant, si l'on ajoute au milieu un acide aminé, le tryptophane par exemple, les enzymes impliquées dans sa synthèse disparaissent rapidement de la cellule. Ce phénomène est connu sous le nom de **répression enzymatique**, qui est dite **coordonnée** lorsqu'elle s'adresse non pas seulement à la dernière enzyme de la séquence de réactions mais à toutes les enzymes de cette séquence. Ce phénomène répond au principe général d'économie de la cellule selon lequel la synthèse d'une ou de plusieurs enzymes s'arrête lorsqu'elles ne sont plus indispensables à la cellule. En général, l'induction est le propre des réactions de dégradation. La répression s'exerce au contraire au cours des réactions de synthèses.

5.2.2.4. Répression par le catabolite

Certains substrats énergétiques majeurs comme le glucose inhibent la synthèse de nombreuses enzymes inductibles et même celle d'enzymes intervenant dans la respiration et le transport des électrons. Ainsi, l'addition de glucose dans un milieu de culture réprime la formation de la β-galactosidase, même en présence de lactose. On peut supposer que la bactérie utilise de préférence la voie catabolique la plus simple, c'est-à-dire la glycolyse ou la fermentation, en bloquant toutes les autres voies cataboliques productrices d'énergie.

5.2.2.5. Divers types de gènes

Sur la molécule d'ADN, les séquences nucléotidiques sont regroupées en gènes (régions de l'ADN responsables de caractères génétiques). Toutes ces régions de l'ADN n'ont pas la même signification physiologique. On peut distinguer en effet quatre types de gènes.

- **Gènes de structure**. Ils portent l'information génétique codant pour une protéine spécifique (une enzyme par exemple).
- **Gènes régulateurs**. Ils codent aussi pour une protéine dont le rôle est de contrôler l'activité d'un gène de structure. Cette protéine, appelée **répresseur**, possède une affinité spécifique pour certaines régions de l'ADN (les gènes opérateurs).

Copyrighted material

• **Gènes opérateurs**. Il s'agit de régions de l'ADN non codantes mais qui peuvent être reconnues de façon spécifique par les répresseurs. Ces gènes sont situés au début d'une région comportant un ou plusieurs gènes de structure dont ils peuvent ainsi contrôler la transcription.

• **Gènes promoteurs**. Adjacents aux précédents, ils servent de sites de fixation de l'ARN polymérase ADN dépendante et permettent ainsi la mise en route de la transcription, d'où leur nom.

Un ensemble comprenant un ou plusieurs gènes de structure contigus, un gène opérateur, un gène promoteur et éventuellement un gène régulateur constitue un **opéron** (le gène régulateur est parfois situé sur une autre région de l'ADN). Un opéron est donc un groupe de gènes de structure liés fonctionnellement, adjacents sur le chromosome et dont les expressions sont sous la dépendance des mêmes gènes régulateurs. L'opérateur tient sous son contrôle la transcription de l'ensemble des gènes de structure.

Ces gènes sont monoblocs et totalement exprimés, ils ne comportent pas, comme dans le cas des gènes eucaryotes, des régions significatives **(exons)** et des régions apparemment sans signification **(introns)** qui seront éliminées lors de la phase de maturation de l'ARN messager (phase qui n'existe donc pas chez les procaryotes).

5.2.3. Fonctionnement de l'opéron

L'existence de tous les éléments du puzzle est donc actuellement démontrée. L'hypothèse de Jacob et Monod reste totalement valable plus de 50 années après avoir été émise.

L'opéron lactose, qui a été le plus étudié, comporte :

– 3 gènes de structure, z, y et a, contigus sur le génome d'*E. coli* et codant la β-galactosidase, la galactoside perméase et la thiogalactoside-acétyltransférase, 3 enzymes impliquées dans la dégradation du lactose ;

– 1 gène opérateur, o, qui contrôle les 3 gènes z, y, a ;

– 1 gène promoteur adjacent au gène o ; il est contrôlé par le gène régulateur i.

L'ensemble fonctionne de la façon suivante : en l'absence d'**inducteur** (lactose), le **répresseur** (protéine) codé par le gène i se fixe sur le site spécifique de l'opérateur, empêchant ainsi la transcription des gènes de structure de l'opéron lactose : la synthèse des enzymes est réprimée. Lorsque l'inducteur (lactose) est présent, il établit des liaisons complémentaires avec le répresseur pour former un complexe répresseur-inducteur. Les modifications de structure du répresseur lui interdisent de s'associer à l'opérateur o. Les gènes de structure sont transcrits en ARNm : la production de l'enzyme est effective. Cette interaction entre l'inducteur et le répresseur est réversible. Le répresseur libéré retrouve son activité initiale. On peut donc considérer le répresseur comme une protéine présentant deux sites spécifiques de fixation, l'un pour l'inducteur, l'autre pour le gène opérateur. De ce fait, on dit que l'opéron lactose est un **système inductible** *(fig. IV.23)*. L'opéron tryptophane est, lui, un **système répressible**. En effet, le système est dans son état normal, fonctionnel, c'est-à-dire que le tryptophane est synthétisé. Interviennent ici les mêmes éléments qu'au cours de l'induction, à savoir une série de gènes de structure qui commandent la synthèse des différentes enzymes de la chaîne de biosynthèse et un gène opérateur. Deux points particuliers caractérisent ce système *(fig. IV.24)* :

– le gène régulateur produit un répresseur incomplet, donc inactif, incapable de s'unir à l'opérateur et de bloquer son activité ;

– un élément nouveau, le **corépresseur**, est susceptible de se combiner avec le répresseur pour le compléter et lui rendre sa pleine activité. Dans le cas de la synthèse du tryptophane au cours de laquelle interviennent plusieurs enzymes, c'est le tryptophane, le produit final de la réaction, qui joue le rôle de corépresseur.

5.2.4. Régulation allostérique

Au cours de la régulation de la synthèse des enzymes (induction ou répression), le niveau maximal ou minimal d'activité ne peut être atteint qu'après une phase plus ou moins longue de latence. Un autre mécanisme de régulation, celui qui régit l'activité enzymatique, peut intervenir, au contraire, sans aucune période préliminaire, provoquant un changement immédiat du métabolisme. Toutes les étapes du métabolisme peuvent être soumises à ces modifications. Les enzymes responsables sont appelées **allostériques**. Deux propriétés principales les distinguent des enzymes isostériques :

– elles sont inactivées ou inhibées par des composés ou effecteurs qui n'ont aucune analogie structurale avec le substrat de l'enzyme ;

– elles possèdent au moins deux sortes différentes de sites de combinaison permettant l'attachement de petites molécules : les **sites catalytiques** occupés par les substrats, les **sites allostériques** correspondant aux **effecteurs** allostériques. La vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat s'inscrit sous forme d'une courbe sigmoïde et non pas hyperbolique comme cela est observé avec les enzymes isostériques (michaeliennes).

Dans les chaînes de biosynthèse, les enzymes qui interviennent dans les premières étapes des séquences de biosynthèse sont allostériques. Leur activité est sujette à un phénomène de **rétro-inhibition** *(feedback inhibition)* par le produit final qui résulte de la série séquentielle d'étapes.

5.2.5. Application à la production de biomasse et de protéines

Les « fermentations industrielles » à partir de substrats économiques (mélasses, lactosérum, bagasses…) ont souvent pour but la production de biomasse (levure de boulangerie, levure diététique, compléments alimentaires pour animaux…). Ces productions sont rarement purifiées. De nombreux micro-organismes, fongiques ou bacté-

Copyrighted material

i p o z y a ADN

ARNm CRP-AMPc σ ARNm

ARN polymérase

β-galactosidase Perméase Acétylase

CRP + AMP cyclique

lac lac

r r

+ inducteur

Répresseur actif Répresseur inactif

Figure IV.23 – **Représentation schématique de l'opéron lactose et de sa régulation.**

En l'absence de l'inducteur (un ß-galactoside), le répresseur, codé par le gène i, se fixe à l'opérateur o et empêche la transcription des gène de structures z, y et a, respectivement de la ß-galactosidase, de la perméase et de la transacétylase. Lorsque l'inducteur est présent, il se fixe au répresseur, lui donnant une conformation inactive incapable de se fixer à l'opérateur, permettant ainsi à l'ARN polymérase fixée par la subunité s au gène promoteur p de transcrire les gènes de structures en ARNm polycistronique. Cependant, l'ARN polymérase ne peut fonctionner que si le gène p est combiné à la protéine réceptrice de l'AMP cyclique (CRP) activée par l'AMPc (le glucose empêche cette activation : effet glucose).

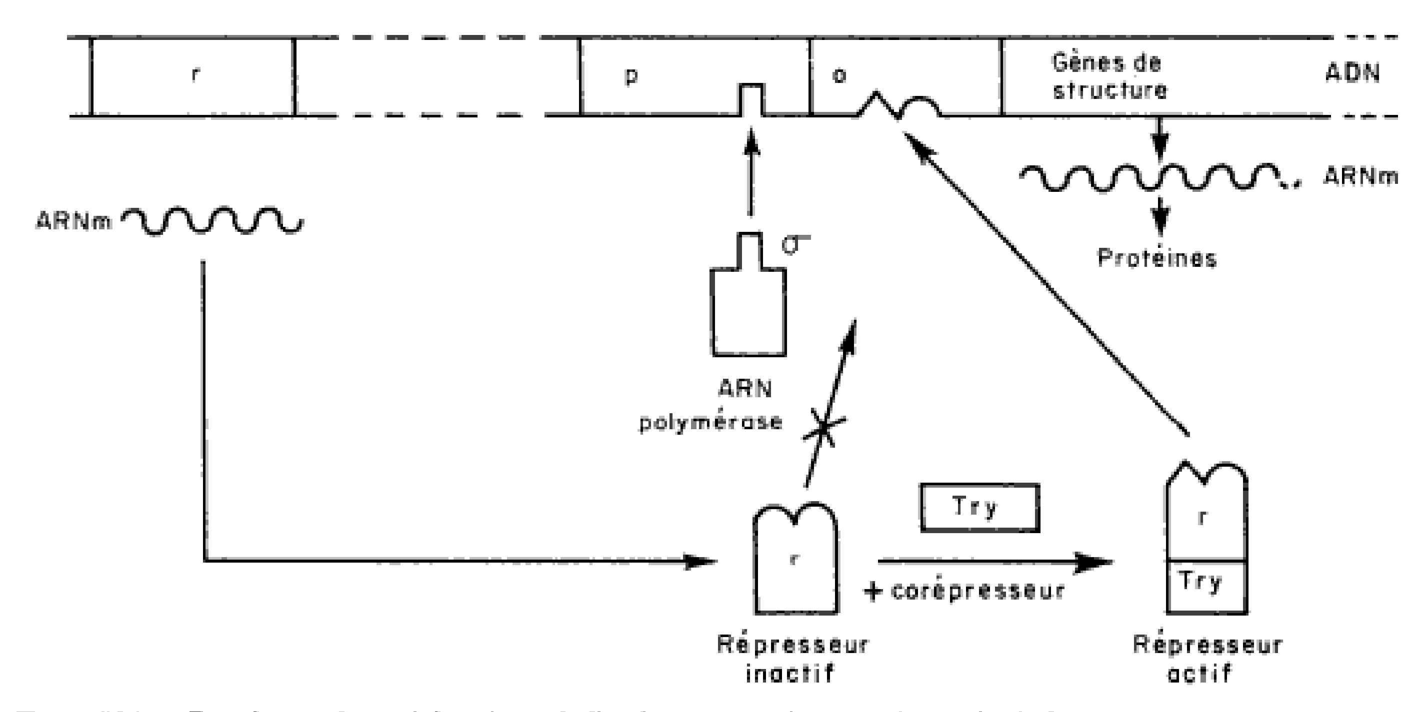


Figure IV.24 – **Représentation schématique de l'opéron tryptophane et de sa régulation.**

En l'absence du corépresseur (le tryptophane), le répresseur, codé par le gène r, ne peut pas se fixer à l'opérateur o, les gènes de structures peuvent être transcrit en ARNm par l'ARN polymérase. En présence du corépresseur, le répresseur devient actif et se fixe à l'opérateur, empêchant la transcription des gènes de structure.

Copyrighted material

riens, peuvent être utilisés et sélectionnés en fonction de leurs caractéristiques : stabilité génétique, possibilité de culture en continu, spécificité pour le substrat, rendement, exigences nutritives, facilité de la séparation de la biomasse, etc. La production d'acides aminés n'est pas naturelle car, du fait des régulations, les cellules ne produisent que les acides aminés immédiatement incorporés dans les protéines et il faut donc utiliser des souches mutantes dérégulées (une souche de *Micrococcus glutamicus* sert pour la synthèse de L-glutamine).

6. Autres métabolismes

6.1. Métabolisme des lipides

Les lipides sont, rappelons-le, des esters acides gras à poids moléculaire élevé. La cellule bactérienne, comme toutes les cellules vivantes, contient des lipides. Les enzymes microbiennes qui les dégradent (ou **lipases**) transforment le substrat en ses deux composants, acide gras et glycérol, s'il s'agit d'un glycéride. L'un et l'autre sont réintégrés dans le **métabolisme intermédiaire**, le premier après avoir été transformé en fragments dicarbonés, puis converti en acétylcoenzyme A, le second représentant un des intermédiaires tricarbonés de la voie glycolytique. On peut aussi rechercher ces enzymes dans un but diagnostique. On distingue par convention les lipases vraies qui dégradent les triglycérides insolubles comme la tributyrine, les estérases capables d'hydrolyser d'autres substrats tels les *tweens* (esters du sorbitol et d'acides gras) et la lécithinase.

Ca. tropicalis ou *Yarrowia lipolytica* sont utilisés pour l'assimilation des hydrocarbures et dérivés.

La production de lipides par des micro-organismes (jusqu'à 30 % du poids sec de certaines levures et champignons) est une source économique. Par exemple, l'acide arachidonique par *Mortierella*.

6.2. Métabolisme des acides nucléiques

La dégradation des acides nucléiques, ADN et ARN, conduit à la libération des nucléotides qui pourront être utilisés lors des synthèses d'ADN et d'ARN bactériens. La recherche des ADNases, présentes chez les *Staphylococcus* pathogènes par exemple, se fait sur une gélose à l'ADN ; ces enzymes étant le plus souvent des exoenzymes, la disparition de l'ADN du milieu révèle leur présence.

La synthèse industrielle de nucléotides et de nucléosides par des souches microbiennes comme *Micrococcus*, *Brevibacterium* ou *Bacillus* est courante au Japon (1 200 t/an de GMP utilisé comme exhausteur de goût).

La source d'énergie de tous les organismes chimiotrophes est la même : elle provient toujours de l'oxydation de composés chimiques. Une grande variété de types métaboliques peut être définie en faisant appel à deux critères : la nature du composé « donneur d'hydrogène » et celle du produit « accepteur d'hydrogène ».

7. Types métaboliques

7.1. Lithotrophes aérobies

Les bactéries chimiolithotrophes aérobies tirent leur énergie de l'oxydation de substrats inorganiques. C'est l'oxygène atmosphérique qui est l'accepteur final d'électrons. Certaines de ces bactéries peuvent oxyder également des composés organiques. Pour synthétiser leurs constituants cellulaires, elles utilisent le CO_2 comme seule source de carbone. La plupart sont des bactéries du sol. Certaines jouent un rôle extrêmement important dans les cycles biologiques naturels.

7.1.1. Bactéries nitrifiantes

Ce sont des germes strictement aérobies qui se développent dans les couches superficielles des terres meubles et dans les eaux polluées où ils participent activement à l'épuration biologique. Les *Nitrosomonas* oxydent l'azote ammoniacal en nitrites tandis que les *Nitrobacter* complètent le travail précédent en oxydant les nitrites en nitrates.

Copyrighted material

7.1.2. Bactéries oxydant le soufre

Elles appartiennent à deux groupes très différents. Le premier comprend les *Beggiatoa* et les *Thiothrix*, organismes très proches des algues bleues mais non photosynthétiques ; le second est celui des *Thiobacillus*. Petits bacilles à Gram négatif, à cils polaires, rencontrés dans le sol et les eaux, ils sont caractérisés par leur résistance extrêmement élevée à l'acidité ; ils supportent en effet un pH voisin de 1. Ils oxydent les diverses formes de soufre réduit et assurent la formation des sulfates. Ce sont de redoutables agents de corrosion (maladie de la pierre, corrosion des canalisations).

Les *Thiobacillus* interviennent aussi dans la **biolixiviation** des minéraux (fig. IV.25) ; ce procédé demande des pH très acides (de 2 à 3) qui peuvent être obtenus par le métabolisme microbien lors de l'oxydation des sulfures ou du soufre en acide sulfurique, permettant ainsi l'exploitation de minerai à faible teneur. On récupère ainsi du cuivre, du cobalt, de l'uranium, etc.

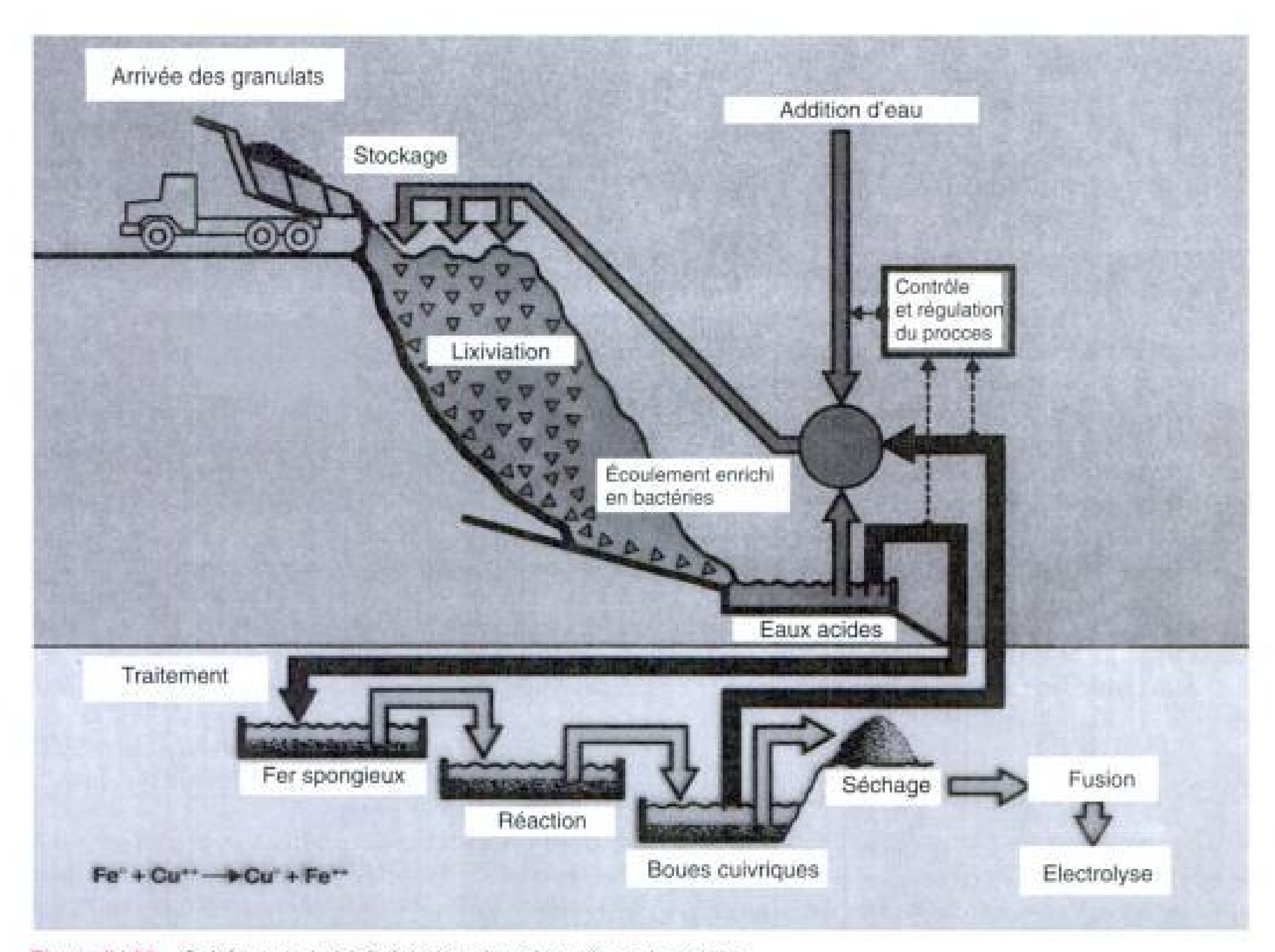


Figure IV.25 – **Schéma de la biolixiviation dans les mises de cuivre.**

Le minerai concassé est arrosé par une solution acide contenant les micro-organismes (*Thiobacillus*), les liquides de ruissellement sont récupérés (une partie est renvoyée sur le tas) et traités par passage sur un lit de fer.

7.1.3. Bactéries du fer et du manganèse

On attribue à trois groupes de micro-organismes le pouvoir d'oxyder les ions ferreux en ions ferriques :

– les bactéries filamenteuses et à gaines du groupe *Sphaerotilus*, *Leptothrix* ;

– les bactéries du genre *Gallionella* ;

– certains *Thiobacillus*.

Les *Sphaerotilus*, à vrai dire, n'ont pas leur place parmi les organismes chimiolithotrophes. Ils oxydent en effet de nombreuses substances organiques et sont connus pour participer activement à l'autoépuration de certaines eaux polluées.

Au cours du traitement des eaux usées par les boues activées, ils sont quelquefois responsables du *bulking*, c'est-à-dire de leur prise en masse, empêchant ainsi toute épuration. La précipitation de fer au niveau de leurs gaines n'est peut-être qu'un épiphénomène et non pas le résultat d'une oxyda-

Copyrighted material

tion directe. Les *Leptothrix*, en revanche, seraient engagés directement dans les réactions d'oxydation (oxydation du manganèse).

Les *Gallionella*, bactéries pédonculées, se rencontrent dans les milieux naturels contenant du fer, en particulier dans les eaux pures des canalisations où elles s'imprègnent d'oxyde ferrique et constituent des masses visqueuses capables d'obstruer totalement la lumière des conduites.

7.2. Lithotrophes anaérobies

Les bactéries lithotrophes anaérobies se distinguent des précédentes par la nature de l'accepteur d'électrons qui est ici un composé inorganique autre que l'oxygène. Il s'agit le plus fréquemment d'un nitrate ou d'un sulfate. L'hydrogène gazeux ou des composés soufrés comme les sulfures ou les thiosulfates sont les donneurs d'hydrogène.

7.2.1. Réducteurs de nitrates

La réduction des nitrates en nitrites ou en ammoniac est effectuée par un très grand nombre d'espèces microbiennes banales *(E. coli, Bacillus, Pseudomonas).* Le groupe des dénitrifiants *stricto sensu*, c'est-à-dire réduisant NO^3 en N^2, est beaucoup plus restreint. Il comprend, entre autres, des lithotrophes comme *T. denitrificans*, oxydant les composés réduits du soufre et réduisant NO^3 en NO^2, NO puis N^2. Cette oxydation des produits soufrés ne peut avoir lieu en anaérobiose qu'en présence de NO^3.

En couplant les bactéries nitrifiantes (qui transforment l'azote organique en nitrate) avec des bactéries dénitrifiantes (qui transforment les nitrates en azote), on réalise la base biologique d'une station d'épuration d'effluents organiques.

7.2.2. Réducteurs de sulfates

Les bactéries sulfatoréductrices sont les agents biologiques majeurs du processus naturel de réduction du soufre. Elles sont bien connues en raison des phénomènes de corrosion des métaux ferreux dont elles sont responsables. Germes ubiquitaires, on les rencontre pratiquement toujours dans le sol, les eaux douces ou les eaux salées. L'espèce type est appelée *D. desulfuricans* à cause de son pouvoir de transformation des sulfates en H_2S et de sa forme incurvée. Pendant longtemps, on a cru à tort que ces germes avaient sporulé, d'où l'ancien nom *Sporovibrio desulfuricans*. Germes anaérobies stricts, ils se développent pourtant dans des zones voisines de l'aérobiose et ont une faculté de résistance assez exceptionnelle vis-à-vis de l'oxygène. Ils possèdent une hydrogénase. Ils utilisent le CO_2 comme seule source de carbone, l'azote aminé ou ammoniacal et même l'azote atmosphérique comme source d'azote. Capables d'oxyder l'hydrogène gazeux, ils peuvent aussi vivre en hétérotrophie, en oxydant des substrats organiques comme le lactate ou le pyruvate. On utilise de telles substances dans les milieux de culture pour favoriser leur isolement.

7.3. Organotrophes aérobies

Le donneur d'hydrogène est ici un composé organique et l'accepteur n'est autre que l'oxygène moléculaire. Ce type métabolique extrêmement répandu comprend de nombreux schémas. La nature du substrat et du produit formé à la suite de l'oxydation doit être prise en considération pour les établir.

7.3.1. Substrat oxydable

Le groupe des organotrophes renferme des types capables d'oxyder seulement quelques corps organiques : *Diplococcus glycinophilus* n'en utilise qu'un seul, le glycocolle. D'autres, à l'opposé, peuvent dégrader des dizaines de substrats : les *Pseudomonas* sont certainement les plus richement doués (certains d'entre eux peuvent oxyder plus de 90 composés organiques différents). En fait, on peut affirmer que très rares sont les substances organiques qui ne sont pas biodégradables.

7.3.2. Produit oxydé

D'une façon générale, l'oxydation du substrat est complète et aboutit à la formation de gaz carbonique et, en même temps, la croissance du germe est assurée. Certaines bactéries, en revanche, ne possèdent pas les enzymes nécessaires à toutes les étapes de la dégradation. Un produit va alors s'accumuler. Il sera caractéristique du type de micro-organisme. Tels sont l'acide fumarique, l'acide citrique, l'acide oxalique et, surtout, l'acide acétique.

Les bactéries qui synthétisent ainsi de l'acide acétique au cours de leur croissance sont appelées bactéries acétiques. On les utilise pour la fabrication du vinaigre à partir de substrats alcooliques comme le vin ou le cidre. Elles oxydent les aldéhydes et les alcools primaires en acide acétique jusqu'à l'épuisement total du substrat.

On en reconnaît deux groupes : les *Acetomonas* à cils polaires catalysant toujours une oxydation incomplète avec production finale d'acide acétique et les *Acetobacter* accomplissent cette première étape puis convertissent en un deuxième temps l'acide acétique en CO_2 et H_2O.

7.4. Organotrophes anaérobies

On les distingue des précédents par la nature de l'accepteur final d'hydrogène qui est le nitrate, le sulfate ou le carbonate. On retrouve dans cette catégorie bon nombre de micro-organismes décrits comme chimiolithotrophes anaérobies. Beaucoup d'entre eux sont en effet capables d'oxyder des composés organiques. Tel est le cas de certains sulfatoréducteurs, de nombreuses bactéries méthanogènes, de même que des réducteurs de nitrates.

Cette distinction est purement formelle depuis que l'on connaît les mécanismes moléculaires en jeu (voir § 4.2).

Copyrighted material

7.5. Organismes fermentants

La fermentation est encore une oxydation biologique au cours de laquelle l'accepteur final d'hydrogène est un composé organique. Cet accepteur peut être un produit de dégradation du substrat oxydable ou une autre substance organique présente dans le milieu. Le substrat oxydable peut aussi jouer ce double rôle : à la fois source d'énergie et accepteur d'électrons libérés. Quelques exemples ont été décrits au § 4.1.1.2. *(fig. IV.26).*

7.6. Archéobactéries

Ce groupe de bactéries atypiques n'a fait l'objet d'un classement cohérent que vers 1980. C'est l'analyse des ARN ribosomaux qui a permis de mettre au jour les relations de parenté entre halophiles, méthanogènes et sulfothermophiles.

Les halophiles semblent descendre des méthanogènes. Certaines méthanogènes présentent d'ailleurs une concentration très élevée de sel dans leur cytoplasme. Les halobactéries (aérobies) auraient pu se différencier à partir de ces méthano-halophiles (anaérobies) en s'adaptant à l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère. La grande majorité des sulfothermophiles est séparée du groupe méthanogène/halophile, même si certaines d'entre elles (les thermococcales) en sont relativement proches. Woese divise les archéobactéries en deux grandes branches : les archéobactéries « diverses » (euryotes), avec les méthanogènes, les halophiles et les thermococcales, et les archéobactéries « ancestrales » (crénotes), qui regroupent toutes les autres sulfothermophiles.

La découverte la plus importante fut faite en 1977, lorsque Woese et ses collaborateurs s'attaquèrent au problème de la phylogénie des bactéries méthanogènes. Pour lui, les bactéries méthanogènes étaient représentatives d'un groupe d'organismes de l'importance des eucaryotes ou de toutes les bactéries non méthanogènes. Il proposa de remplacer la division binaire du monde vivant (eucaryotes/procaryotes) par une division tripartite entre eucaryotes, eubactéries (ou bactéries « vraies ») et archéobactéries (les méthanogènes).

L'appellation « archéobactérie » fait référence à la physiologie des méthanogènes, qui semble adaptée aux conditions de l'atmosphère terrestre primitive (biotopes dépourvus d'oxygène et riches en hydrogène moléculaire et en CO_2).

Depuis longtemps, les halobactéries et les thermoacidophiles avaient suscité la curiosité par la structure de leurs lipides membranaires. Chez les eubactéries et les eucaryotes, les lipides sont formés par l'association d'une molécule de glycérol et de deux molécules d'acide gras par l'intermédiaire d'une liaison ester. Par contre, les halophiles et les thermoacidophiles se distinguent des eubactéries par trois caractéristiques principales :

– la paroi ne contient pas de peptidoglycane ;

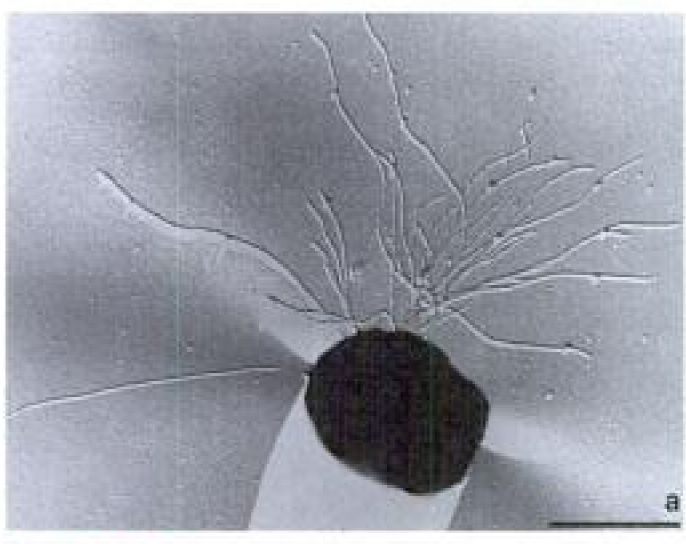
– les lipides membranaires sont des chaînes aliphatiques liées par liaison éther au glycérol (et non ester) ;

– les ARN de transfert ne contiennent pas de thymine.

Les archéobactéries se répartissent en trois groupes.

7.6.1. Méthanogènes

Ces bactéries du sol ont le pouvoir de produire du méthane à partir de carbonate. Elles tirent leur énergie de l'oxydation anaérobie de composés minéraux ou de substances organiques simples, comme l'acide formique ou certains acides gras supérieurs. Ces bactéries dites méthanogènes comprennent



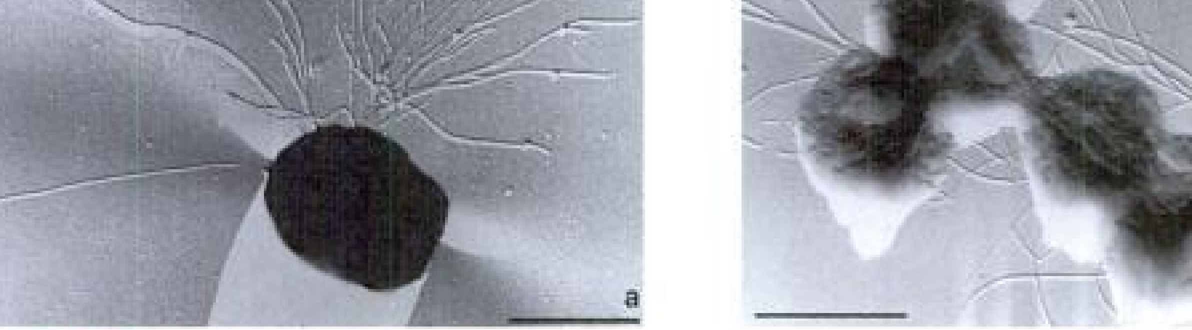


Figure IV.26 –

a : Pyrococcus furiosus

b : Thermococcus aggregans

M.E.T. après ombrage au platine d'archéobactéries hyperthermophiles (température optimale 80 °C) flagellées (la barre vaut 1 µm) *(Avec l'aimable autorisation du Prof. Dr. K O Stetter et du Dr. Reinhard Rachel, Université de Regensburg, Centre des Archées, D-93040 Allemagne).*

Copyrighted material

quatre sous-groupes différenciés par leur morphologie : les *Methanobacterium* non sporulés, les *Methanobacillus* sporulés, les *Methanococcus* et les *Methanosarcina*.

Les archéobactéries méthanogènes sont toutes anaérobies strictes. Le mécanisme de synthèse du méthane fait intervenir de nombreuses enzymes et coenzymes que l'on ne trouve que chez ces micro-organismes. La plupart des méthanogènes vivent à des températures comprises entre 20 et 50 °C, mais il existe également des espèces thermophiles et même des hyperthermophiles, tel *Methanopyrus*, qui rivalisent avec *Pyrodictium* en croissant jusqu'à 110 °C. On trouve toutes les formes possibles et imaginables chez les méthanogènes : coques, bacilles, spirilles, etc.

On les rencontre dans les zones profondes des étangs, des marais, des tourbières, dans les sources chaudes terrestres et sous-marines, dans le tube digestif des animaux (l'homme compris) où les conditions d'anaérobiose favorisent leur développement ; les « feux follets » en sont une manifestation visible.

Le méthane produit par les méthanogènes explique la présence de ces « feux follets » que l'on observe parfois à la surface d'eaux stagnantes.

7.6.2. Halophiles extrêmes (*Halobacterium* et *Halococcus*)

Les archéobactéries halophiles (« aimant le sel »), encore appelées halobactéries, vivent dans les eaux à forte teneur en chlorure de sodium (NaCl) tels les lacs salés et les marais salants. Certaines, appelées haloalcaliphiles, vivent dans les lacs de soude riches en carbonate de sodium, à des pH voisins de 10.

Les *Halobacterium* sont des bacilles qui peuvent changer de forme au cours de leur croissance ; les *Halococcus* sont des coques avec une paroi rigide. Toutes ces archéobactéries sont des halophiles extrêmes obligatoires, ce sont des bactéries marines aérobies strictes possédant un système photosynthétique simple à base de bactériorhodopsine.

Les halobactéries sont connues et étudiées depuis longtemps car elles étaient souvent responsables de la dégradation des aliments à l'époque où ceux-ci étaient conservés dans le sel. Les aliments pourrissaient en prenant une couleur rouge. Cette couleur est due à une protéine, la bactériorubérine, qui leur sert d'écran protecteur contre les rayons solaires. Les halobactéries sont responsables de la coloration rouge des marais salants.

7.6.3. Thermo-acidophiles

Les thermo-acidophiles vivent à la fois à haute température (entre 60 et 80 °C) et à pH acide (compris entre 1 et 3). Les *Sulfolobus* et les *Thermoplasma* aérobies qui vivent en surface ont été découvertes au début des années 1970, dans des résidus de mines de charbon en combustion lente et dans les sources chaudes (solfatares) du parc de Yellowstone.

Ces micro-organismes obtiennent leur énergie de l'oxydation du soufre en acide sulfurique. Certains sont autotrophes, d'autres sont chimio-autotrophes et peuvent assimiler directement le carbone minéral en utilisant l'énergie libérée par la réduction du soufre. La plupart peuvent vivre à des températures nettement supérieures à 80 °C. Par exemple, *Pyrococcus furiosus* (« la coque brûlante furieuse ») et *Pyrobaculum islandicum* (« le bâton brûlant d'Islande ») croissent à des températures comprises entre 85 et 100 °C ; ce sont des « hyperthermophiles ». La découverte la plus spectaculaire fut faite dans les sources chaudes sous-marines. Dans ces biotopes, la pression permet à l'eau de rester liquide à des températures supérieures à 100 °C. Cela a permis d'isoler, en 1982, *Pyrodictium* (« les doigts de feu ») dont la température optimale de croissance est de 105 °C et qui pousse encore à 110 °C, 110-113 °C restant actuellement la limite supérieure de température pour la vie sur la Terre.

Les *Thermoproteales* anaérobies sont les hôtes spécifiques des sources d'eau chaude sulfureuse. Ils réduisent le soufre en H_2S à partir de substrats organiques comme source d'électrons.

Les protéines des hyperthermophiles résistent à des conditions de température qui inactivent complètement la majorité des enzymes « classiques ». Certaines peuvent être autoclavées à 120 °C sans perdre leur activité. Cette stabilité est obtenue par le nombre de liaisons intramoléculaires qui stabilisent le repliement de la chaîne d'acides aminés sur elle-même. À basse température, ces protéines sont bien plus rigides que les protéines classiques. Ce n'est qu'à haute température, grâce à l'agitation thermique, qu'elles retrouvent la fluidité indispensable à leur activité.

Les membranes de ces archéobactéries sont particulièrement bien adaptées aux très hautes températures. La liaison éther, qui caractérise les lipides des archéobactéries, est plus stable à haute température que la liaison ester des lipides classiques. De plus, une couche unique, de même épaisseur mais beaucoup plus rigide, remplace la bicouche traditionnelle.

8. Applications du métabolisme

Un certain nombre d'applications des divers métabolismes a été déjà décrit. Il y en a d'autres qui font appel à plusieurs métabolismes. Avec le développement des biotechnologies, leur importance va croissant, aussi bien dans l'industrie qu'au laboratoire.

Copyrighted material

8.1. Applications agroalimentaires

En dehors des quelques applications déjà citées et qui sont en général monomicrobiennes, la plupart des produits issus de l'activité microbienne sont le résultat d'actions complexes de plusieurs espèces, simultanée ou successive.

Le rôle des micro-organismes est très varié :

– les **ferments lactiques** (lactobacilles et *Streptococcus* lactiques). À partir du lait, ils conduisent à la préparation des fromages et yaourts. Ils assurent l'abaissement du pH du lait (par la production de l'acide lactique) et l'élaboration des caractères organoleptiques lors de l'affinage des fromages (grâce à des enzymes protéolytiques). La fermentation lactique est encore mise en œuvre dans la préparation de la choucroute et dans la conservation du fourrage en silo ;

– les différentes sortes de fromages se distinguent par une fermentation secondaire : les bactéries propioniques dans l'affinage et la maturation des gruyères et emmentals. Les *Kluyveromyces*, les *Torulopsis* et les *Candida* sont majoritaires dans le fromage de type cantal, les *Debaryomyces* dans les pâtes pressées ou à croûte lavée. Des champignons filamenteux ont également une grande importance dans cette industrie, en particulier *Penicillium* et *Geotrichum candidum*. Ces champignons produisent le feutrage de la surface des fromages de type camembert *(Pe. camembertii)*, les veinures bleu-vert des fromages à pâtes persillées de type roquefort *(Pe. roquefortii)* et l'aromatisation des fromages à pâte pressée de type saint-nectaire *(G. candidum)*. Ces espèces possèdent les propriétés suivantes : consommation d'acide lactique, protéolyse et lipolyse, qui jouent un rôle dans la maturation des fromages. L'évolution des micro-organismes au cours de l'affinage est caractéristique de chaque type de fromage car elle dépend très étroitement du « processus » technique ;

– dans la fabrication des saucisses et saucissons, des moisissures et des levures se développent à la surface des boyaux et des pièces de viande fermentée *(Pe. chrysogenum, Geotrichum fragrans, Ca. deformans, Ca. zeilanoides, Debaryomyces hansenii, Rhodotorula rubra...)* et contribuent à leur aromatisation. *Pe. nalgiovense* est utilisé dans l'industrie des salaisons où il produit la couverture blanche (la « fleur ») sur les saucissons qui fournit une protection efficace vis-à-vis des moisissures contaminantes ;

– les micro-organismes sont retrouvés dans la fermentation alcoolique, qui est à la base de la production du vin, de la bière, des boissons alcoolisées distillées et de la texture du pain, ainsi que dans la production industrielle d'alcool. La fermentation du jus de raisin est assurée par plusieurs levures dont les actions se succèdent pour atteindre différents degrés alcooliques. Les levures des genres *Kloeckera, Hansenula* et *Hanseniaspora* permettent d'atteindre jusqu'à 3 ou 4 degrés d'alcool, les *Saccharomyces* prennent le relais pour porter le degré alcoolique à 11-15 °GL, voire 18 °GL avec certaines souches ;

– les fermentations des produits sucrés sont donc d'une grande importance économique. L'industrie recherche aussi certains produits de fermentation ou la production de biomasse ou encore les enzymes bactériennes *(tab. III-14)*, en particulier pour une meilleure maîtrise des flaveurs et des arômes des produits alimentaires.

De nombreux autres aliments fermentés à base de levures sont consommés dans le monde. La sauce de soja, le plus vieil assaisonnement existant, est produite par fermentation du soja cuit, ou de la farine de soja délipidée, et de blé en présence d'une forte concentration de sel sous l'action successive de moisissures *(A. oryzae, A. soyae)* pendant 3 jours puis de levures *(Zygosaccharomyces rouxii)* et de bactéries *(Pediococcus halophilus)* pendant 8 à 10 mois à température ambiante. *Gestricum candidum* est impliqué dans plusieurs aliments fermentés à base de maïs (le kenkey), de riz (le torani), de fruits (le poï).

Les graines de cacao doivent subir une fermentation de 2 à 9 jours qui implique l'action successive de levures *(Saccharomyces, Hansenula, Pichia)* produisant de l'éthanol, de bactéries *(Acetobacter)* donnant de l'acide acétique et qui

Copyrighted material

conduit à diminuer les teneurs en caféine, en sucres réducteurs et en tanin.

Les effluents divers peuvent être épurés par certaines espèces fongiques, tout en produisant une importante biomasse : usines de pâte à papier *(Paecilomyces variotii)*, pulpe de betterave *(Trichoderma album)*, distillerie d'alcool de pomme *(A. niger)*, de whisky *(Gestricum candidum)*, vinasse de sucre de canne *(Phanerochaete chrysosporium)*. Les déchets de végétaux peuvent être décomposés en compost par certaines espèces thermophiles, comme *Chaetomium thermophile* ou *Humicola lanuginosa*.

L'utilisation des **bactéries méthylotrophes** (*Methylobacter, Methylococcus*, etc.) permet l'utilisation du méthanol issu du méthane dans les industries pétrolières et d'obtenir ainsi de grandes quantités de biomasse. Les levures méthylotrophes peuvent servir à la synthèse en chimie fine : synthèse d'ATP *(Ca. boidinii)*, de dihydroxyacétone et de glycérol (souches mutantes d'*Hansenula polymorpha*), alcool oxydase *(Pichia pastoris)*. *C. utilis* est produit à partir de l'éthanol sur lequel il se développe plus facilement que les bactéries.

On peut également produire des biomasses à l'aide de micro-organismes adaptés à partir des paraffines, des mélasses, de lactosérum, de cellulose ou d'autres sous-produits ou déchets fermentescibles. Les « levures aliments », ou POU (protéines d'organismes unicellulaires), autorisées dans l'alimentation humaine et animale, correspondent à la définition suivante : « Levure tuée, privée de pouvoirs fermentaires, séchée, n'ayant subi ni extraction ni ajout. » Elles doivent appartenir aux espèces *S. cerevisiae, K. lactis et K. marxianus (K. fragilis)*, appelées aussi « levures lactiques », *C. utilis, Yarrowia lipolytica, Pichia pastoris*. Elles sont incorporées dans diverses préparations alimentaires comme exhausteurs de goût, ou pour leurs pouvoirs liant, épaississant, stabilisant…, ou utilisées en l'état (cas du fameux « bouillon Kub ») pour leurs propriétés aromatisantes. Elles supplémentent les relations humaines ou animales en raison de leur richesse particulière en protéines (> 45 %), en acides nucléiques, glutathion, lysine, choline, vitamines du groupe B, sels minéraux.

8.2. Applications industrielles

8.2.1. Production d'enzymes

Toutes les enzymes qui sont apparues dans le métabolisme peuvent être purifiées après culture de micro-organismes choisis comme étant particulièrement producteurs. Citons quelques enzymes commercialement importantes car issues de bactéries thermophiles : amylases des *Bacillus*, protéases de *Thermus aquaticus*, cellulase de *Cl. thermocellum*, etc.

8.2.2. Production de métabolites primaires

• **Acides aminés**. L'utilisation de souches dérégulées (chez lesquelles les gènes régulateurs ont été rendus inopérants) pour produire des acides aminés a l'avantage, par rapport aux méthodes chimiques, de conduire uniquement aux formes naturelles. La production mondiale atteint 370 000 tonnes pour l'acide L-glutamique (*Micrococcus glutamicum* produit plus de 100 $g \cdot L^{-1}$ à partir de mélasses), 70 000 tonnes pour la L-lysine *(Achromobacter obae, Brevibacterium lactofermentum)*, etc. ; 66 % de la production sert à la nutrition humaine, 33 % à la nutrition animale, le reste à des applications médicales ou industrielles. Les 2/3 des acides aminés produits sont utilisés pour la nutrition humaine (glutamate dans les assaisonnements, aspartame [asparagine + phénylalanine] comme édulcorant). Le reste sert à la nourriture des animaux, pour compléter les plantes pauvres en acides aminés essentiels (méthionine, lysine). Les applications médicales ne concernent que 1 % de la production sous forme de mélanges d'acides aminés utilisés directement au cours des ulcères (glutamine, histidine), des maladies hépatiques (citrulline, ornithine).

• **Acides organiques**. Trois cent mille tonnes d'acide acétique et 600 000 tonnes d'acide citrique sont, entre autres, produites annuellement par voie biotechnologique.

La production d'acide acétique est surtout le fait de l'industrie du vinaigre avec l'utilisation de souches d'*Acetobacter* (l'industrie chimique en produit 2 500 000 t/an !).

L'acide citrique, dont plus de 60 % sert comme additif à l'alimentation, est utilisé dans l'industrie

Copyrighted material

alimentaire (boisson, confiture, etc.), dans l'industrie pharmaceutique et des cosmétiques, dans celle des plastiques sous la forme d'esters, dans la purification des métaux grâce à son pouvoir chélatant. Il est principalement produit à partir de mélasses par *A. niger* qui possède une forte activité citrate synthétase, ainsi que l'acide gluconique (acidulant alimentaire) ; l'acide citrique peut également être produit par *Yarrowia lipolytica* à partir de n-alcanes.

L'acide fumarique (utilisé dans l'industrie des plastiques) est produit par *Rhizopus nigricans* ou *R. arrhizus ;* l'acide itaconique (industrie des peintures et des plastiques) par *A. terreus* et l'acide kojique par *A. flavus.*

L'acide lactique, très utilisé pour ses propriétés conservatrices (boissons, jus de fruits, confitures…), est produit à partir de lactosérum par des *Lactobacillus.*

• **Alcools et solvants**. En dehors de l'éthanol (vin, bière, etc.), il faut noter la production de butane 2,3-diol par *Enterobacter aerogenes* ou *B. subtilis* à partir de mélasses ou d'amidon, de glycérol par *B. subtilis,* de xylitol (utilisé comme succédané de sucre) par des levures.

• **Lipides**. Ils sont produits essentiellement par de nombreuses espèces fongiques (*Candida, Hansenula, Lipomyces, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium,* etc.) qui sont capables de produire de telles substances à partir de substrats divers, tels que les n-alcanes, la mélasse, des sucres divers, etc. Les lipides produits peuvent être de composition très diverse, comprenant des triacylglycérols, diacylglycérols et monoacylglycérols, des stérols, des phospholipides, des glycolipides et des acides gras libres (acide palmitique, stéarique, oléique, linoléique, arachidonique, etc.).

Trichoderma reesii est utilisé pour la production de lipides à partir de déchets agricoles, comme *Aspergillus ochraceus,* important producteur d'acide linoléique.

• **Polysaccharides**. Ces composés s'utilisent aussi bien dans l'agroalimentaire (gélifiant, ballasts) que dans l'industrie (extraction du pétrole, adhésifs…) et qu'en médecine (substituts du plasma), voire qu'en biotechnologie (inclusion de cellules dans des billes d'alginate). Le tableau IV.2 en donne quelques exemples. Ils sont extraits de plantes ou d'algues, mais leur production microbiologique a l'avantage de fournir une grande diversité de molécules facilement extractibles (production extracellulaire), en quantité et qualité satisfaisantes indépendamment des conditions climatiques et modifiables en faisant varier les conditions de culture.

• **Vitamines**. Plus de 100 000 tonnes de vitamines (dont 60 000 de vitamine C) sont produites par an, dont plus 60 % est utilisé dans l'alimentation. La vitamine B_{12} est produite par *Propionibacterium shermanii* ou *Ps. denitrificans ;* la vitamine C, surtout produite par voie chimique, peut aussi être obtenue avec *Acetobacter suboxydans*. La riboflavine est synthétisée par un champignon levuriforme, *Ashbya gossypii,* le β-carotène, qui peut servir de précurseur de la vitamine A, l'est par *Blakeslea trispora* ou *Rhodotorula gracilis* et l'ergostérol, convertible en vitamine D, par *Sc. cerevisiae* ou *A. niger.*

• **Additifs alimentaires**. Les pigments alimentaires sont de plus en plus utilisés pour rendre plus agréables certains aliments ; les problèmes posés par les colorants chimiques font que la demande de colorants « naturels » est de plus en plus forte. Les β-caroténoïdes synthétisés par des levures (par

Tableau IV.2 – Production des polysaccharides.

Polysaccharides	Micro-organismes producteurs	Utilisations principales
Dextranes	*Leuconostoc mesenteroides*	Pharmacie
Alginates	*Azotobacter*	Alimentation, biotechnologie
PHB (poly-hydroxybuthyrate)	*Alcaligenes lactus* *Metylobacterium organophilum*	Biopolymères, emballages, médecine (implants…)
Agar	Diverses algues	Bactériologie

Copyrighted material

exemple, *Rhodotorulla*) peuvent servir à la fois de colorants et de précurseurs de la vitamine A pour la nourriture des animaux.

8.2.3. Production de métabolites secondaires

Des milliers de molécules différentes peuvent être extraites de cultures microbiennes (surtout chez des champignons et plus particulièrement les *Streptomyces*). Les métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité (de 1 à 20 $mg \cdot L^{-1}$) par les souches sauvages, alors qu'une production ne devient rentable qu'à partir d'une synthèse de 5 $g \cdot L^{-1}$. L'amélioration du rendement repose sur l'optimisation des procédés de fermentation et la modification des souches, par recherche de mutants spontanés, par mutation dirigée lorsque les bases génétiques de la biosynthèse du métabolite sont connues, ou encore par construction de souches par croisement, fusion de protoplastes ou manipulation génétique.

On trouve ainsi des produits pharmacologiques :

– **alcaloïdes**, par *Claviceps purpurea* qui fournit plus de 40 alcaloïdes différents, dérivés d'un noyau tétracyclique (ergoline) et aux très nombreux usages thérapeutiques : hémorragies utérines (méthylergométrine), migraines (ergotamine, dihydroergotamine), syndromes orthostatiques, insuffisance veineuse fonctionnelle (dihydroergotamine), perturbations fonctionnelles neuropsychiques et psychomotrices (dihydroergotoxine), certaines stérilités, aménorrhées et galactorrhées (bromocryptine). La production des alcaloïdes s'effectue dans des cellules riches en lipides, comparables aux cellules du sclérote, obtenues sur milieux riches en glucides, contenant des sels ammoniacaux, des acides carboxyliques et du phosphate ;

– **antibiotiques**. Dans certaines conditions de culture, certaines espèces microbiennes (champignons surtout) produisent des antibiotiques : céphalosporines (résistantes aux β-lactamines de *St. aureus*) par *Cephalosporium acremonium*, fumagilline par *A. fumigatus*, griséofulvine (antibiotique antifongique actif contre les dermatophytes) par *Pe. griseofulvum*, pénicillines par *Pe. chrysogenum*, acide fusidique par *Fusidium coccineum*. Des recherches visent à l'augmentation du rendement et à la modification de la régulation, par exemple des β-lactamines par voie génétique, chez les souches productrices de pénicilline et de céphalosporine ;

– **immunodépresseurs**. La cyclosporine A est synthétisée par plusieurs champignons, dont *Tolypocladium inflatum*. Cet immunodépresseur a révolutionné la transplantation d'organes et de moelle par ses propriétés de blocage de la synthèse de l'interleukine 2 inhibant le phénomène de rejet.

On trouve aussi :

– des insecticides *(Bacillus thurirengis)* ;

– des arômes produits par des bactéries (*Ps. fragi* pour l'éthybutyrate à l'arôme de fraise) et, surtout, des champignons (*Aspergillus* entre autres) servant à aromatiser par exemple les yaourts.

8.2.4. Production d'énergie

La production de méthane par fermentation de lisier ou de fumier s'effectue en particulier dans les pays en développement (15 kg de matière organique sèche donnent 3 m^3 de gaz à 55 % de méthane).

L'éthanol produit comme carburant (par exemple, au Brésil 10 000 000 tonnes à partir de mélasse de canne à sucre) souffre chez nous d'un prix de revient non compétitif. Les 4/5 de l'éthanol produit dans le monde sont obtenus par fermentation (le reste étant synthétisé à partir de l'éthylène) à partir de sources renouvelables et disponibles en grandes quantités (sucres et amidon d'origine agricole, cellulose des déchets industriels et urbains). Les matières premières disponibles pouvant conduire à la fabrication d'alcool-carburant sont réparties en trois groupes :

– les produits sucrés directement fermentescibles (mélasse de betterave ou de canne à sucre) ; 3,3 tonnes de mélasse permettent l'obtention de 1 tonne d'alcool. Classiquement, la biosynthèse de l'éthanol s'effectue avec *Sc. cerevisiae* qui est capable de fermenter directement le jus de betterave, plus difficilement les mélasses. Des cocultures permettent d'augmenter le rendement de production d'éthanol *(Endomycopsis fibuliger/Sc. cerevisiae, A. niger/Sc. cerevisiae)* ;

– les produits amylacés, présents dans les tubercules, racines ou graines. La préparation du moût de fermentation nécessite alors une hydrolyse par voie chimique ou enzymatique. En climat tropical (Brésil, Indonésie, etc.), les racines de manioc sont une source prometteuse : 10 tonnes de manioc permettent de préparer 1 tonne d'alcool. Parmi les graines amylacées, le riz en Asie, le maïs aux États-Unis, l'avoine et le seigle en Europe de l'Est sont utilisés depuis longtemps comme source d'éthanol ;

– les produits cellulosiques, qui nécessitent souvent, comme l'amidon, un prétraitement hydrolytique destiné à libérer les monomères glucidiques. Cela implique l'intervention de cellulases produites essentiellement par des moisissures du genre *Aspergillus* ou *Trichoderma*, ou la réalisation de cultures mixtes levures-bactéries, ces dernières assurant la dégradation de la cellulose en glucides qui seront alors fermentés par des levures. L'utilisation de souches

Copyrighted material

comme *Cl. thermocellum*, qui peut transformer la cellulose en éthanol, pourrait changer les données économiques du problème.

Des hydrocarbures synthétisés par *Botryococcus braunii* (une algue chlorophycée) représentent une source renouvelable de carburants liquides, de cires et de surfactants.

8.3. Biodégradation des polluants

8.3.1. Biodégradation des métaux lourds

Les micro-organismes interagissent avec les métaux selon deux grands types d'actions :

– en modifiant l'environnement : potentiel redox modifié entraînant une oxydation du métal (par modification de sa valence) et, ainsi, le rendant plus soluble ; acidification du milieu permettant aussi de garder le métal en solution ;

– plus spécifiquement en formant des complexes solubles avec le métal par production de métabolites (acide citrique, pyruvique…).

Selon la source d'énergie utilisée, deux types de micro-organismes peuvent être impliqués :

– des chimio-organotrophes tels les bactéries du genre *Cellulomonas* ;

– des chimiolithotrophes du genre *Thiobacillus* notamment (voir chap IV-7.), *T. ferroxydans* et *T. thioparus*.

D'autres mécanismes existent aussi :

– précipitation des ions métalliques sous forme de sulfure par des bactéries sulfatoréductrices en présence de nutriments organiques, de sulfates et en anaérobiose ;

– complexation par des micro-organismes synthétisant des métabolites à grande affinité pour les métaux (protéines, polysaccharides) ;

– absorption des métaux par la biomasse (vivante ou morte) sur les sites membranaires (carbonyles, phosphoryles, hydroxyles…), par exemple l'uranium (*Streptomyces* sp.), le plomb et le cadmium (*Citrobacter* sp.), le cobalt, le cuivre et le nickel (*Zooglea* sp.), l'argent *(T. ferroxydans)*…

8.3.2. Biodégradation des hydrocarbures et des rejets industriels

La pollution par hydrocarbures (de 30 à 70 % d'hydrocarbures saturés, de 20 à 40 % d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques, de 5 à 25 % d'hydrocarbures polaires et de 0 à 10 % d'asphaltènes) pose de gros problèmes d'élimination. Les cas les plus connus sont les naufrages de grands pétroliers (1967 : le *Torrey Canyon* au large des côtes de Cornouailles ; 1978 : l'*Amoco Cadiz* près de Portsall dans le Finistère ; 1989 : l'*Exxon Valdès* sur la côte pacifique du Canada ; plus près de nous, en 2003, le *Prestige* au large de la Galice en Espagne). Malgré tout, ces événements accidentels et exceptionnels ne représentent que 10 % des hydrocarbures rejetés en mer ! D'autres sources existent : dégazages (22 % des hydrocarbures rejetés), fuites naturelles au fond des océans, déjections urbaines et fluviales, retombées atmosphériques, émanations des raffineries, fuites des plateformes *off shore*.

Afin d'éliminer cette pollution, l'emploi de méthodes physicochimiques (évaporation, solubilisation, émulsification, sédimentation, photo-oxydation) a montré rapidement ses limites et même peut se révéler néfaste (toxicité de certains dispersants ou des émulsions qu'ils forment). On a donc été amené à développer l'utilisation des micro-organismes.

Dans un premier temps, la biodégradation naturelle par les souches sauvages a été étudiée et reste le plus important mécanisme de dégradation naturelle. Ainsi, les groupes bactériens suivants s'avèrent des « dépollueurs » prépondérants : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*… En fait, une seule souche ne peut généralement pas métaboliser à elle seule les polluants. Une « communauté » de micro-organismes est requise, chacune des espèces réalisant une partie du processus de dégradation. Elles doivent travailler en synergie et une déficience en l'une d'entre elles diminue fortement l'efficacité du traitement. Des « cocktails » de bactéries non pathogènes ont ainsi été mis au point : système Bacta-Pur®, procédé *oilzapper* mis au point en Inde combinant cinq espèces bactériennes choisies en fonction de la composition des déchets.

Le traitement des nappes souterraines polluées peut se faire par injection dans le sous-sol de cultures bactériennes (par exemple *Arthrobacter*, *Azotobacter*) en présence d'eau oxygénée et de nutriments minéraux (KNO_3, K_2HPO_4, KH_2PO_4).

D'une manière générale, on peut utiliser aussi les micro-organismes pour le traitement des rejets provenant des industries chimiques et contenant des substances toxiques (pesticides, composés halogénés, chlorés, benzène, toluène, hydrocarbures aromatiques…). On peut traiter directement les effluents rejetés ou les sols et nappes phréatiques contaminés. Ce sont essentiellement les germes du genre *Pseudomonas* qui sont utilisés : dégradation de la diméthylamine *(aminovorans)*, du phénol et du camphre *(putida)*, du P-crésol *(fluorescens)*, du 2,4,5 trichlorobenzoate *(cepacia)*, du trinitrotoluène *(aeruginosa)*… D'autres micro-organismes peuvent être aussi utilisés : *Enterobacter* dégrade l'insecticide DDT, *Brevibacterium* les dioxines, *Aspergillus* la cellulose, *Acremonium charticola* le caoutchouc vulcanisé, *Cladosporium resinae* le kérosène…

8.4. Applications au laboratoire

L'identification des bactéries repose en grande partie sur ces caractères biochimiques dont la mise en évidence constitue l'essentiel de la galerie

Copyrighted material

d'identification. Ces caractères sont la traduction du métabolisme bactérien ; la connaissance de celui-ci permettra donc de prévoir les caractères biochimiques et vice-versa. Quelques exemples significatifs de milieux d'identification seront décrits pour en expliquer le fonctionnement.

8.4.1. Milieux d'étude du métabolisme énergétique

• **Milieu viande-foie (VF)**. Ce milieu riche, à base de viande, de foie et de glucose, doit présenter une variation continue du potentiel d'oxydoréduction (rH_2) depuis $rH_2 = 20$ en surface jusqu'à des valeurs de l'ordre de 7,5 en profondeur, ce qui traduit un gradient de concentration en oxygène dissous. De plus, aucun composé du milieu ne doit permettre la respiration anaérobie (absence de nitrates). Dans ces conditions, les bactéries pourront se développer partout où elles trouvent un rH_2 favorable :

– les aérobies strictes ont besoin d'oxygène (chaîne respiratoire) et donc se développent à un rH_2 élevé (en surface) ;

– les anaérobies strictes ne supportant pas l'O_2 se développent à un rH_2 bas (au fond du tube) ;

– les aéro-anaérobies sont insensibles au rH_2 car, selon le cas, elles fermentent ou oxydent le substrat. Certaines anaérobies strictes tolérantes à l'O_2 comme les *Streptococcus* se multiplieront aussi dans tout le tube.

• **Recherche de l'oxydase**. Les bactéries en voie de croissance sur un milieu ne contenant pas de sucres fermentescibles qui pourraient inhiber la synthèse des cytochromes sont mises au contact d'une solution (fraîche) de N-tétraméthyl-paraphénylène diamine (TMPD) qui se comporte comme un donneur artificiel d'électrons et prend une coloration violacée par oxydation ; le TMPD est oxydé au niveau de la partie terminale de certaines chaînes de cytochromes possédant des cytochromes c.

• **Réduction des nitrates**. La recherche de la nitrate réductase (NR) sur un milieu nitraté (gélose ou bouillon nitraté, milieu mannitol-mobilité) par le réactif de Griess permet de mettre en évidence la production de nitrites. Or, il y a deux NR et la réduction des nitrates peut dépasser le stade nitrite. Pour interpréter le résultat on peut :

– en absence de nitrites, rechercher si les nitrates sont encore présents (par leur décomposition en nitrites par le zinc) ;

– déterminer le type de NR (A ou B) par l'utilisation d'un milieu VF contenant du chlorate de potassium. Ce composé joue le rôle d'analogue structural des nitrates pour la NR A avec production de chlorites toxiques (pas de culture), alors que la NR B ne peut pas dégrader le chlorate (culture positive).

On reconnaîtra alors si la souche étudiée utilise les nitrates pour une respiration anaérobie ou comme source d'azote.

• **Auxanogramme**. L'auxanogramme permet de déterminer la nature des substrats utilisés par les micro-organismes comme source d'énergie et de carbone (éventuellement comme source d'azote). Sur un milieu de base chimiquement défini (contenant les sels minéraux et les facteurs de croissance), on dépose le substrat sous forme d'une microgouttelette ou à l'aide d'un disque de papier-filtre imprégné de la solution du substrat. Une croissance est le propre des bactéries qui absorbent, métabolisent le substrat et l'utilisent comme unique source de carbone et d'énergie. Le milieu au citrate de Simmons est un exemple où le substrat (citrate de sodium) y est incorporé.

8.4.2. Milieux d'étude du métabolisme glucidique

• **Milieu de Clark et Lubs**. Ce milieu glucosé est le plus courant pour étudier les voies de fermentations du glucose ; on peut aussi utiliser une eau peptonée glucosée avec cloche. La réaction du rouge de méthyl (RM) met en évidence les fermentations acides, en particulier la fermentation acide mixte. Le test doit être réalisé au bout de 48 heures de culture lorsque la production d'acides est stabilisée car certaines bactéries sont capables de métaboliser les acides produits, d'où une évolution du pH *(fig. IV.27)*.

La réaction Voges-Prosckauer (VP) met en évidence la voie du butylène-glycol *(fig. IV.14)*. Grâce à la cloche, on pourra déceler la production de gaz et, par addition de soude au milieu, la proportion de CO_2.

• **Milieu de Kligler-Hajna**. Les fermentations qui se développent sur ce milieu résultent d'une interaction entre différents métabolismes sous l'effet de régulations liées aux composants du milieu (glucose, lactose, protéines et aussi l'O_2 de l'air).

Dans le culot (rH_2 relativement bas), l'absence d'O_2 et la présence de glucose répriment l'opéron lactose ; c'est l'effet glucose qui s'exprime chaque fois qu'il y a simultanément, dans un milieu, un métabolite facilement utilisable, comme le glucose, et un autre métabolite dépendant d'un système de régulation inductible comme le lactose (on l'appelle aussi répression catabolique). L'acidification est donc due à la fermentation du glucose (en acide lactique, formique, etc.) par

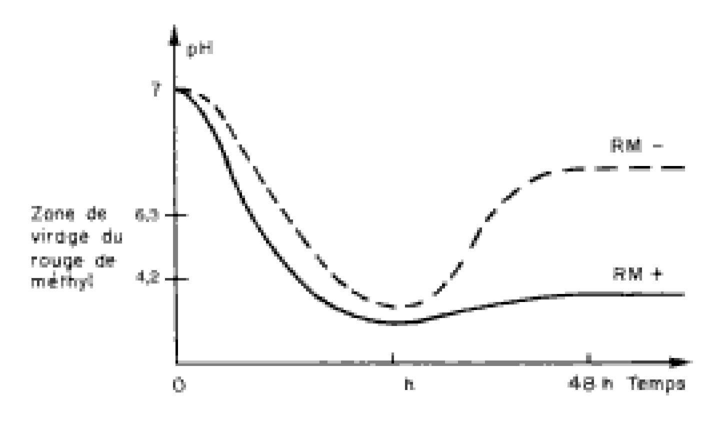


Figure IV.27 – **Évolution du pH en fonction du temps d'une culture fermentant le glucose sur milieu de Clark et Lubs.**

Copyrighted material

des voies comme les fermentations homolactiques ou hétérolactiques ou encore la fermentation acide mixte, le gaz étant le CO_2 ou l'H_2 dégagé lors de ces fermentations. Sur la pente (en présence d'O_2), le glucose étant rapidement utilisé, l'effet glucose sera faible ou nul. Le lactose va pouvoir jouer son rôle d'inducteur de l'opéron lactose (cette induction est aussi favorisée par l'O_2). L'acidification est donc liée à la fermentation du lactose. On peut vérifier l'induction de l'opéron lactose par le test ONPG, analogue structural du lactose qui est scindé par la galactosidase en ONP (jaune) et galactose. Il faut signaler que ce test peut également être positif en présence d'une ONPGase, enzyme que possèdent certaines bactéries lactose négatives.

Le milieu de Kligler permet encore de déceler la dégradation de la lysine issue des protéines sous l'action de la lysine décarboxylase (LDC) et la production d'H_2S dont l'origine peut être :

– la désulfuration d'acides aminés soufrés ;

– la réduction de l'hyposulfite de sodium par une voie de type respiration anaérobie.

• **Milieu mannitol-mobilité.** La fermentation du mannitol se fait avec production d'acides (le pH diminue) dont, selon les bactéries, l'acide formique qui peut être décomposé par la formate hydrogène lyase suivant la réaction :

$$HCOOH \rightarrow CO_2 + H_2.$$

Pour empêcher la production de gaz qui rendrait impossible la lecture du caractère mobilité, on ajoute un inhibiteur de cette enzyme, le nitrate de potassium. Mais les nitrates peuvent être le substrat d'une respiration anaérobie avec production d'azote ; ce milieu est donc impropre pour tester le caractère mobilité de germes comme les *Pseudomonas*.

8.4.3. Milieux d'étude du métabolisme protidique

• **Milieu lysine-fer**. La lysine peut être décarboxylée par les micro-organismes LDC^+ en cadavérine, amine qui provoque une élévation du pH. Étant donné que la LDC n'est synthétisée qu'en milieu acide (pH = 6), une acidification préalable du milieu par fermentation de glucose est nécessaire ; c'est pour cette raison que ce milieu contient une faible quantité de glucose et ne doit être employé que pour des germes $glucose^+$. Les germes LDC^-, fermentant uniquement le glucose, font baisser le pH.

La décarboxylation peut aussi être mise en évidence par extraction de la cadavérine puis coloration en présence de ninhydrine (à partir milieu de Kligler).

La lysine peut être désaminée sous l'action lysine désaminase (LDA) en présence d'oxygène (donc sur la pente du milieu) avec production d'un α-cétoacide qui est révélé par les sels de fer du milieu (coloration rouge bourgogne) (voir § 5.1.3.1.).

La production d'H_2S en milieu basique les germes LDC^+ est mise en évidence par le noircissement dû à la formation de sulfure de fer ; l'origine en est la même que sur milieu de Kligler.

• **Milieu urée-indole**. Ce milieu synthétique (voir § 5.1.3.3.) permet de révéler trois voies métaboliques :

– la dégradation de l'urée et donc la présence d'une uréase ;

– la dégradation du tryptophane en indole ;

– la dégradation du tryptophane en α-cétoacide par la TDA qui est mis en évidence par $FeCl_3$ (coloration brune).

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

1. En utilisant les connaissances de biochimie métabolique :
– présenter succinctement les mécanismes de la production d'énergie au cours de la respiration aérobie et anaérobie ;
– définir les fermentations ;
– décrire et expliciter la technique utilisée pour déterminer les types respiratoires ;
– représenter les aspects obtenus pour les quatre principaux : aérobie strict, aéro-anaérobie, anaérobie strict, micro-aérophile.

2. En mobilisant les connaissances de biochimie métabolique, décrire à partir des documents fournis dans le chapitre les voies suivantes du catabolisme glucidique :
– glycolyse et cycle de Krebs ;
– shunt de l'hexose monophosphate ;
– fermentation homolactique et hétérolactique ;
– fermentation acide mixte, butane diolique, butanoïque, acétonobutylique et propionique.

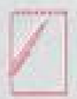
3. Décrire des applications des fermentations :
– dans la production d'aliments ;
– dans les techniques de l'identification microbienne.

4. Montrer l'intérêt des techniques d'étude du catabolisme glucidique pour l'identification des micro-organismes.

5. En mobilisant vos acquis, décrire les principales techniques d'étude du catabolisme des glucides.

6. Présenter les étapes de la transformation, par des bactéries, d'une protéine (gélatine, caséine…) en ses différents produits de dégradation.

7. En mobilisant vos acquis, décrire les principales techniques d'étude du métabolisme protidique chez les bactéries.



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes.

1. Le.......................... est l'ensemble des réactions qui convertissent les nutriments en métabolites nécessaires aux biosynthèses.

2. La respiration correspond, chez un organisme, à la possession d'une.............................. liée à une.............. cellulaire et entraînant un..................... d'électrons dans un sens et un flux équivalent de................. dans l'autre sens.

3. La.................. correspond à la présence de.. n'entraînant pas automatiquement de flux................ ou de protons de part et d'autre d'une...................

4. Les cytochromes sont des................... à groupement prosthétique..........................

5. Les................. (glucamylases) sont exclusivement.............................

6. La première enzyme qui intervient pour dégrader la protéine est la.......................

7. La.................. des acides aminés libère le groupe............ sous forme de CO_2 et une.................

8. L'utilisation de souches.................. (chez lesquelles les gènes régulateurs ont été rendus inopérants), pour produire des acides aminés, a l'avantage sur les méthodes chimiques de conduire uniquement aux.....................

9. .... permet de déterminer la nature des substrats utilisés par les micro-organismes comme source d'énergie et de carbone.

10. La lysine peut être désaminée sous l'action de la.......................... en présence d'oxygène (donc sur la...... du milieu......) avec production d'un........................ qui sera mis en évidence par une réaction.............. avec un sel de.......

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. La photosynthèse bactérienne utilise les mêmes pigments et les mêmes réactions que celle des végétaux.

2. Un organisme aérobie strict ne peut pas utiliser la respiration dite anaérobie en l'absence d'oxygène.

Copyrighted material

3. La fermentation du glucose libère autant d'énergie que sa respiration dite anaérobie.

4. L'ATP est la seule réserve d'énergie utilisable directement.

5. Le glucose est le seul sucre utilisable directement par tous les micro-organismes.

6. Le cycle de Krebs libère beaucoup d'énergie.

7. La dégradation des amino-acides libère peu ou pas d'énergie.

8. On peut rechercher un type métabolique sur un milieu MEVAG contenant du fructose.

9. La fermentation alcoolique est essentiellement réalisée par des bactéries.

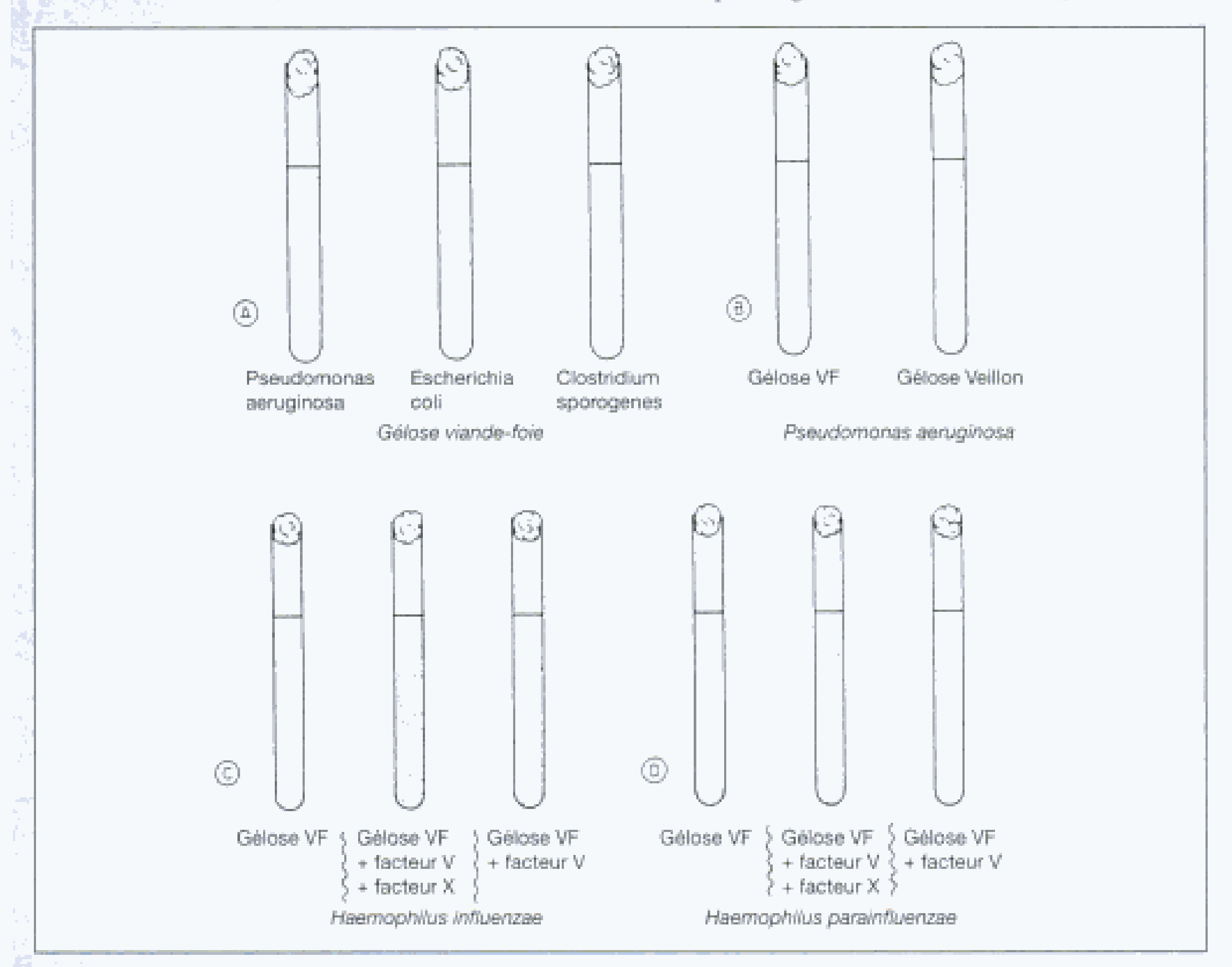
10. Le pyruvate est une plaque tournante du métabolisme intermédiaire.

3. Métabolisme respiratoire

1. Pour rechercher le type respiratoire de trois bactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Clostridium sporogenes*, on les ensemence en gélose profonde viande-foie dont la composition est :

– base viande-foie, 30 g ;
– glucose, 2 g ;
– agar, 6 g ;
– eau distillée, 1 l.

Les résultats obtenus après 24 heures d'incubation sont donnés par la figure A.



1.1. Quel est le type respiratoire de chacune de ces bactéries ?

1.2. Indiquer succinctement, pour chacun de ces trois cas, la voie de dégradation du glucose et préciser la nature de l'accepteur final d'électrons.

1.3. Justifier l'absence de culture de *Clostridium sporogenes* dans la partie supérieure du tube et le développement de *Pseudononas aeruginosa* et d'*Escherichia coli* dans cette zone.

2. La figure B montre la différence de comportement de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencé en gélose profonde viande-foie et en gélose de Veillon. Expliquer le résultat obtenu en gélose de Veillon sachant que la composition de ce milieu est la suivante :

– macération de viande de bœuf, 50 mL ;
– eau, 500 mL ;
– peptone, 20 g ;
– gélose, 8 g ;

– glucose, 10 g ;
– nitrate de potassium, 1 g.

2.1. Comment désigne-t-on le métabolique mis en œuvre ?

2.2. Quel est l'accepteur final d'électron ?

2.3. Quelle enzyme caractéristique peut-on mettre en évidence ?

3. *Haemophilus influenzae* ne se développe en gélose viande-foie que lorsque ce milieu est enrichi en facteurs V et X. La figure c donne les résultats obtenus pour germe.

3.1. Comment désigne-t-on des germes qui ont un tel comportement ?

3.2. Sachant que le facteur X est un précurseur des cytochromes et que le facteur V en est un du NAD, interpréter les résultats obtenus.

4. La figure d indique les résultats obtenus dans le cas d'*Haemophilus para influenzae.* Quelle est l'exigence de ce germe ?

4. Métabolisme respiratoire de *Rhodospirillum rubrum*

Rhodospirillum rubrum est une bactérie qui :
peut se multiplier en aérobiose, à l'obscurité, en utilisant comme substrat des substances organiques de diverses natures (alcools, acides gras, acides aminés…) ;
– peut se multiplier en anaérobiose à condition d'être à la lumière et en présence des substances organiques précitées. Dans ce cas, si on marque au ^{14}C le CO_2 du milieu, les bactéries incorporent le carbone radioactif dans leurs constituants organiques ;
– nécessite pour sa croissance de la biotine (vitamine H).

1. Quel est le type respiratoire de *Rh. rubrum ?* Quels sont les accepteurs finals d'électrons et de protons possibles pour *Rh. rubrum* en anaérobiose ?

2. Quel est le type trophique en aérobiose ? Préciser le rôle des substances organiques dans ce cas.

3. Quel est le type trophique en anaérobiose ? Les substances organiques jouent-elles le même rôle que dans le cas précédent ? Quel est le rôle du dioxyde de carbone ?

4. Quels sont les autres types trophiques bactériens ? En préciser les principales caractéristiques (source de carbone, source d'énergie, rôle du donneur d'électrons et de protons).

5. Qu'est la biotine pour *Rh. rubrum ?* Citer les autres catégories de substances pouvant avoir le même rôle, préciser alors les mécanismes généraux d'action.

5. Métabolisme respiratoire de *Pseudomonas aeruginosa*

« Les *Pseudomonadaceae* constituent le modèle des bactéries aérobies strictes, c'est-à-dire à métabolisme strictement respiratoire, dépourvues de métabolisme fermentatif des glucides. En aérobiose, le bacille pyocyanique utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Dans des milieux peu tamponnés, il est capable de produire de faibles quantités d'acide par oxydation de nombreux sucres aldéhydiques (par exemple, glucose)… Malgré son métabolisme respiratoire strict, il peut utiliser d'autres accepteurs finals d'électrons, en l'absence d'oxygène. Cette propriété lui permet de croître en anaérobiose dans des milieux organiques très divers, à condition qu'un accepteur convenable d'électrons soit présent, en particulier le nitrate. »

1. Comment peut-on mettre en évidence au laboratoire le type respiratoire de *Ps. aeruginosa ?* Préciser la composition du milieu utilisé, son mode de présentation, son mode d'utilisation. Faire un schéma montrant le résultat de la culture obtenue.

2. *Ps. aeruginosa* possède deux types respiratoires ; les redéfinir à partir du texte ci-dessus.

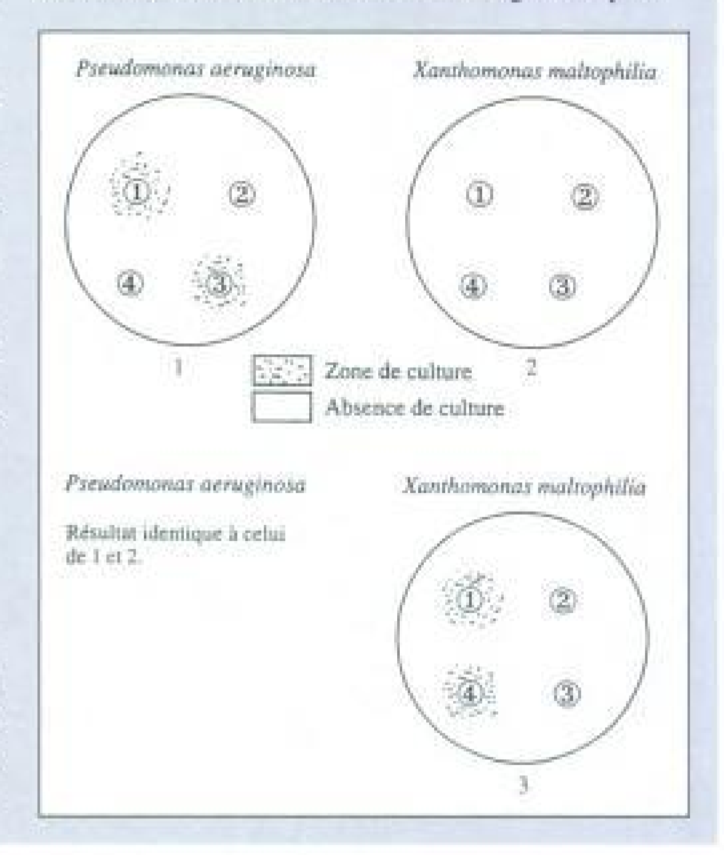
3. On ensemence un milieu mannitol-mobilité avec une culture pure de cette bactérie. Faire un schéma montrant le résultat de la culture obtenue et justifier cet aspect.

6. Étude comparative des métabolismes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas maltophilia*

Sur un milieu M1, présenté en boîte de Pétri, on effectue un auxanogramme. On réalise un ensemencement par inondation avec la souche à étudier. Après séchage de la surface du milieu, on dépose 4 disques contenant différentes substances carbonées. Le milieu est ensuite incubé 48 heures à 37 °C.

On donne la composition du milieu M1 : agar, NaCl, NH_4Cl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $MgSO_4$, eau distillée.
Les substances contenues dans les disques sont les suivantes : 1) glucose ; 2) maltose ; 3) mannitol : 4) inositol.

Les résultats obtenus sont donnés sur la figure ci-après.



Copyrighted material

On réalise la même technique sur un milieu M2 de composition : M1 + méthionine.

Les résultats obtenus alors sont représentés figure 3.

1. À quel type de milieux appartiennent M1 et M2 ?

2. Quel est le but d'un auxanogramme ?

3. Interpréter les résultats pour *Ps. aeruginosa*.

4. En définissant le rôle de la méthionine dans le milieu M2, interpréter les résultats obtenus pour *Ps. maltophilia*.

5. Qu'est-ce qu'un « type trophique » ? Quel est celui des deux espèces étudiées ? Expliquer.

7. Métabolisme des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à deux genres principaux : *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

1. Proposer une définition des bactéries lactiques.

2. Le catabolisme du glucose conduit à des produits variés selon la voie fermentaire utilisée. Quelques exemples figurent dans le tableau ci-dessous.

Espèces	Voie de fermentation du glucose
Lactobacillus bulgaricus	Homofermentaire
Lactobacillus casei	Homofermentaire
Lactobacillus fermentii	Hétérofermentaire
Lactobacillus viridescens	Hétérofermentaire

2.1. Définir le mot « fermentation » et montrer en quoi ce processus diffère de la respiration aérobie et de la respiration anaérobie.

2.2. Expliciter les termes « homofermentaire » et « hétérofermentaire ».

2.3. Comment, au laboratoire, est-il possible de distinguer les deux processus ?

3. Les lactobacilles n'utilisent pas l'oxygène libre pour leur métabolisme, préférant une atmosphère riche en CO_2 : ils sont anaérobies aérotolérants. L'incubation est alors réalisée soit en microaérobiose, soit en anaérobiose. Quels moyens sont utilisés en pratique pour respecter ces conditions ?

8. Métabolisme énergétique de *Bacillus subtilis*

1. *Bacillus subtilis* est une bactérie aérobie stricte.

Citer le milieu de culture qui permet de mettre en évidence ce type respiratoire et donner son principe d'utilisation. Faire un schéma du résultat obtenu avec *Bacillus subtilis*.

2. Indiquer quelle voie de dégradation du glucose cette bactérie peut utiliser et préciser la nature de l'accepteur final d'électrons.

3. Cette bactérie peut cultiver en absence d'oxygène, quand on lui fournit dans le milieu des nitrates. Expliquer ce phénomène.

9. Photosynthèse chez les micro-organismes

1. Écrire l'équation générale de la photosynthèse chez les sulfo-bactéries. Présenter les principales différences avec la photosynthèse végétale.

2. Parmi les bactéries photosynthétiques, on trouve les pourpres sulfureuses photolithotrophes et les pourpres sulfureuses photo-organotrophes.

2.1. Expliciter les deux termes : photolithotrophes et photo-organotrophes.

2.2. Quels sont les autres types trophiques bactériens ? En préciser les principales caractéristiques (source de carbone, source d'énergie, rôle du donneur d'électrons et de protons).

10. Métabolisme des archéobactéries

1. Pour s'adapter à un environnement extrême, les archéobactéries ont développé des voies métaboliques particulières. Les halophiles extrêmes vivant dans les eaux salées comme la mer Morte possèdent une chaîne respiratoire aérobie qui leur permet de synthétiser leur ATP par couplage chimio-osmotique. Elles possèdent de plus une protéine membranaire, la bactériorhodopsine, qui se comporte comme une pompe à protons « actionnée » par l'énergie lumineuse. Celle-ci constitue une source énergétique dans un milieu où la concentration en oxygène est faible à cause de la forte teneur en sels.

Présenter, sous forme d'un schéma légendé et commenté, le mécanisme du couplage chimio-osmotique de la formation d'ATP. Placer l'intervention de la bactériorhodopsine dans ce schéma.

2. Dans les mers, les estuaires et les zones côtières à forte teneur en sulfate (SO_4^{2-}) et dans les zones d'activité volcanique à forte teneur en soufre élément (SO), les archéobactéries réalisent, selon les disponibilités en substrat carboné et en oxygène :

– soit la réduction dissimilatrice des sulfates ou du soufre en sulfure (S^{2-}). En présence de substrats organiques comme le lactate, le bilan métabolique est :

$2(CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH) + SO_4^{2-} \rightarrow 2\,(CH_3\text{-}COOH) + 2\,CO_2 + 2\,H_2O + S^{2-}$ (cas A).

En présence de substrat inorganique, ces bactéries utilisent le CO_2 et tirent leur énergie de la réaction bilan :

$4\,H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-} + 4\,H_2O$ (cas B) ;

– soit l'oxydation dissimilatrice du soufre en sulfate (SO_4^{2}) :

$SO + 3/2\,O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$ (cas C).

Dans ce cas, elles se développent sur carbone inorganique ou minéral et, en anaérobiose, l'oxygène peut-être remplacé par le fer ferrique ou les nitrates.

Pour chacun de ces trois modes de vie (A, B et C), indiquer sous forme d'un tableau le donneur d'électrons, l'accepteur d'électrons, la nature de la molécule source de carbone, les types trophiques vis-à-vis du carbone et de l'énergie.

CORRIGÉS

1. Compléter par

1. Métabolisme intermédiaire.

2. Chaîne de transport électronique ; membrane ; flux unidirectionnel ; protons.

3. Fermentation ; chaînes de transport électronique intracytoplasmique ; d'électrons ; membrane.

4. Hétéroprotéines ; ferroporphyrinique.

5. γ-amylases ; bactériennes.

6. Protéinase.

7. Décarboxylation ; carboxyl ; amine.

8. Dérégulés ; formes naturelles.

9. L'auxanogramme.

10. Lysine désaminase (LDA) ; pente, lysine-fer ; α-cétoacide, colorée, fer.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : les pigments sont la bactériochlorophylle ou la bactériorhodopsine ; de plus, il n'y a jamais photolyse de l'eau avec production d'O_2.

2. Faux : c'est en général le contraire, à condition naturellement de posséder les systèmes enzymatiques correspondants.

3. Faux : le rendement énergétique est de l'ordre de 2 % en fermentation et il est en général supérieur à 30 % en respiration anaérobie (sur nitrate par exemple).

4. Faux : il y a aussi le gradient électrochimique de protons au niveau de la membrane ainsi que d'autres molécules possédant une liaison riche en énergie (GTP, Ac CoA, PEP…).

5. Faux : il n'est que celui qui est le plus universellement utilisé.

6. Faux : il n'y a qu'un GTP directement libéré, le reste des transporteurs ne donnera de l'énergie utilisable qu'au travers des chaînes respiratoires par exemple.

7. Vrai.

8. Vrai.

9. Faux : elle est beaucoup plus fréquente chez les champignons en particulier les levures (levure de bière…).

10. Vrai.

3. Métabolisme respiratoire

1.1. *Ps. aeruginosa :* aérobie stricte (culture en surface), *E. coli :* aéro-anaérobie (culture en surface et en profondeur), *C. sporogenes :* anaérobie stricte (culture en profondeur uniquement).

1.2. *Ps. aeruginosa :* voie oxydative, ou shunt de l'hexosemonophospahte + chaîne respiratoire sur O_2 ; *E. coli :* en présence d'O_2, on aura une oxydation (par exemple, glycolyse + cycle de Krebs + chaîne respiratoire sur O_2), en l'absence d'O_2 mais en présence de composés organiques, on aura une fermentation (fermentation acide mixte par exemple) ; *C. sporogenes :* fermentation exclusivement (par exemple, glycolyse + fermentation butyrique).

1.3. O_2 toxique pour *Clostridium* (formation de peroxydes qui ne sont pas détruits par absence d'enzymes de type catalase ou peroxydase), O_2 utilisé pour les autres souches (la production éventuelle d'H_2O_2 ou de peroxydes étant neutralisée par des catalases ou des peroxydases).

2.1. Respiration nitrate ou respiration anaérobie.

2.2. L'ion nitrate du nitrate de K.

2.3. Nitrate réductase (en fait celle de type A).

3.1. Auxotrophes car ils ont besoin d'un facteur de croissance.

3.2. *H. influenzae* a besoin de X pour la synthèse des cytochromes (intervenant dans les chaînes respiratoires) et de V pour la synthèse du NAD utilisé dans les fermentations, le tube X + V est aéro-anaérobie, le tube V est fermentatif en anaérobiose.

4. *H. para influenzae* n'a besoin que de V.

4. Métabolisme respiratoire de *Rhodospirillum rubrum*

1. Aéro-anaérobie, accepteur d'électrons = substances organiques, accepteur de protons = CO_2 *via* le NADP.

2. Chimio-organotrophes, les substances organiques sont à la fois source de carbone et source d'énergie.

3. Photo-organotrophes, les substances organiques sont source d'électrons et d'H, le CO_2 est la source de C et l'accepteur d'H^+ (pour la synthèse des sucres par exemple).

4. Chimiolithotrophes et photolithotrophes avec l'intervention de substances minérales (voir chap. III, § 1.), il y a aussi les paratrophes qui tirent leur énergie de l'hôte qu'ils parasitent.

5. C'est un facteur de croissance ; les autres catégories sont :
– les vitamines (incorporées comme cofacteurs enzymatiques) ;
– les amino-acides (pour la synthèse des protéines) ;
– les bases puriques ou pyrimidiques (pour la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques) (voir chap. III, § 1.3.).

5. Métabolisme respiratoire de *Ps. aeruginosa*

1. Milieu VF en tube profond pour obtenir un gradient d'O_2 lors de la régénération (ébullition du milieu pendant au moins une dizaine de minutes), l'ensemencement se fait par piqûre dans le milieu encore liquide mais refroidi à 40 °C suivi d'une solidification immédiate (composition pour 1 litre d'eau distillée : base viande-foie 30 g, glucose 2 g, agar 6 g), on aura uniquement une culture en surface (voir chap. III, § 1.4.).

Copyrighted material

2. Respiration aérobie avec O_2 comme accepteur d'électrons, respiration anaérobie avec les nitrates comme accepteur (voir chap. IV, § 3.2.1.).

3. Culture dans tout le tube avec production de bulles de gaz, la respiration nitrate a conduit à la production d'azote et de CO_2 ; le milieu reste rouge car il n'y a pas d'acides produits.

6. Étude comparative des métabolismes de *Ps. aeruginosa* et *Ps. maltophilia*

1. Milieux synthétiques car tous les ingrédients sont des composés chimiquement bien définis.

2. Mettre en évidence les sources de carbone et d'énergie utilisables par les bactéries.

3. *P. aeruginosa* est capable d'utiliser le glucose ou le mannitol comme seule source de carbone et d'énergie.

4. La méthionine est un facteur de croissance, sa présence est requise pour la croissance et pour pouvoir utiliser le glucose ou l'inositol comme source de carbone et d'énergie.

5. Type trophique (voir chap. III, § 1). Elles sont chimioorganotrophes car elles tirent leur énergie de réactions chimiques d'oxydo-réduction et utilisent des composés organiques (glucose…) comme source d'électrons.

7. Métabolisme des bactéries lactiques

1. Ce sont des bactéries qui tirent leur énergie de la fermentation lactique.

2.1. Processus d'oxydoréduction lié à des chaînes enzymatique cytoplasmique (voir chap. IV, § 3.2) n'entraînant pas de flux de protons à travers une membrane ; la respiration, liée à une chaîne enzymatique membranaire, est productrice d'un potentiel électrochimique de membrane (dans la respiration aérobie, l'accepteur final d'électron est l'O_2, dans la respiration anaérobie, cet accepteur est un autre produit : nitrate, sulfate…).

2.2. Homofermentaire : fermentation produisant exclusivement de l'acide lactique (voir chap. IV, § 4.1.1.2).

Hétérofermentaire : fermentation produisant un mélange d'acide lactique avec d'autres produits (éthanol, CO_2) (voir chap. IV, § 4.1.1.3).

2.3. L'utilisation d'un milieu liquide contenant une cloche de Durham permet de piéger le CO_2.

3. Soit une enceinte hermétique avec une bougie allumée (qui brûlera jusqu'à obtention d'une teneur en CO_2 importante), soit une jarre avec un sachet permettant la production de CO_2 (méthode actuellement la plus utilisée).

8. Métabolisme énergétique de *B. subtilis*

1. *B. subtilis* est une bactérie aérobie stricte.

Milieu VF en tube profond pour obtenir un gradient d'O_2 lors de la régénération (ébullition du milieu pendant au moins une dizaine de minutes), l'ensemencement se fait par piqûre dans le milieu encore liquide mais refroidi à 40 °C suivi d'une solidification immédiate (composition pour 1 litre d'eau distillée : base viande-foie 30 g, glucose 2 g, agar 6 g). *B. subtilis* donne uniquement une culture en surface (voir chap. III, § 1.4.3).

2. Voie Embden-Meyerhoff + cycle de Krebs + chaîne respiratoire avec O_2 comme accepteur final d'électrons (voir chap. IV, § 4.1).

3. C'est la respiration nitrate, l'absence d'O_2 permet la mise en route de la NRA qui elle-même permettra de récupérer les électrons sur le nitrate (voir chap. IV, § 3.2.1).

9. Photosynthèse chez les micro-organismes

1. Voir fig. IV-3.

2.1. Photolithotrophe : organisme qui puise son énergie dans le rayonnement lumineux et qui est capable de se développer dans un milieu uniquement minéral. Photo-organotrophe : organisme qui puise son énergie dans le rayonnement lumineux et qui nécessite un milieu uniquement organique pour se développer.

10. Métabolisme des archéobactéries

1. L'ATP est synthétisée par une enzyme membranaire côté interne, l'ATPase, et plus précisément par sa sous-unité F_1 : ADP + Pi → ATP, phosphorylation liée à la force « protonmotrice » assurée par la sous-unité F_0 intramembranaire. Le retour des protons H^+ vers l'extérieur est assuré ici seulement par un complexe protéique, la bactériorhodopsine, qui fonctionne sous l'influence de la lumière (voir fig. IV-3d).

2.

Cas	Donneur d'e^-	Accepteur d'e^-	Source de carbone	Type trophique/carbone	Type trophique/énergie
A	Lactate	SO_4	Lactate	Photo-organotrophe	Hétérotrophe
B	H_2	SO_4	CO_2	Photolithotrophe	Autotrophe
C	O_2	S^*	C minéral	Photolithotrophe	Autotrophe

Copyrighted material

Le terme **désinfection** est générique, il désigne toute action à visée antimicrobienne, quel que soit le niveau de résultat, utilisant un produit pouvant justifier *in vitro* des propriétés autorisant à le qualifier de désinfectant ou d'antiseptique, soit une réduction de la flore de 99,999 % (abaissement de la flore de 5^{log}). Il devrait toujours être accompagné d'un qualificatif (désinfection du matériel, des sols, des locaux, des mains, des plaies, etc.).

Les **désinfectants** sont des produits ou procédés utilisés pour la désinfection ou la décontamination, dans des conditions définies, de supports inertes exclusivement (sols, matériels…). Les produits ayant les propriétés antimicrobiennes et toxicologiques adéquates pour un usage sur des tissus vivants sont appelés antiseptiques.

La **désinfection** d'une surface inerte avec un désinfectant est donc une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par les milieux inertes contaminés en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération. En cas de contamination postérieure, il faudra recommencer la désinfection.

La **décontamination** est une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. L'usage du terme désinfection en synonyme de décontamination est prohibé.

La définition de la décontamination diffère de celle de la désinfection par deux points importants. D'une part, inhiber les micro-organismes signifie inhiber leur croissance, donc la décontamination n'implique pas obligatoirement leur élimination ; d'autre part, la désinfection ne s'applique qu'aux milieux inertes alors que la décontamination peut s'appliquer aussi à des tissus vivants.

1.1.3. Asepsie-antisepsie

Un milieu est dit **septique** (du grec *septikos* : putréfaction) lorsqu'il contient des micro-organismes ; il est **aseptique** dans le cas contraire. Des conditions rigoureuses d'asepsie sont requises en milieu hospitalier dans les services dits à haut risque (chirurgie, réanimation). Dans les salles d'opération, on cherche par tous les moyens possibles à éviter la contamination du champ opératoire (tenues spéciales du personnel, stérilisation des instruments, préparation du malade). Le perfectionnement le plus spectaculaire dans ce domaine est sans doute la mise au point du **flux laminaire** qui assure, au niveau d'un bloc opératoire, un environnement aseptique (débarrassé de la quasi-totalité des bactéries).

L'**asepsie** est l'ensemble des mesures propres à empêcher tout apport exogène de micro-organismes. Les traitements de désinfection, de décontamination et de stérilisation microbiennes sont des moyens de la réaliser.

L'**antisepsie** est une opération au résultat momentané permettant, au niveau des tissus vivants et dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou aux virus présents au moment de l'opération. La définition de l'antisepsie diffère de celle de la désinfection sur un seul point : l'antisepsie s'applique aux tissus vivants alors que la désinfection s'applique aux milieux inertes. Dire qu'on désinfecte une plaie ne correspond pas à la définition de la désinfection. Les agents **antiseptiques** sont donc des substances chimiques capables de détruire les micro-organismes ou d'arrêter leur action. Le résultat de cette opération est limité à ceux présents au moment de l'application.

Les **désinfectants** et les **antiseptiques**, en raison de leur toxicité, ne peuvent être administrés à l'homme ou aux animaux par voie générale.

1.1.4. Antibiotiques

La toxicité cellulaire des antiseptiques les réserve à un usage local. D'autres substances capables d'agir sur les micro-organismes, tout en étant dépourvues de pouvoir toxique, ont été découvertes. Ces agents, qualifiés de **chimiothérapeutiques**, comprennent les **sulfamides** et les **antibiotiques**.

Copyrighted material

Les premiers sont des produits chimiques obtenus par synthèse. On les appelle encore des **antimétabolites**. En raison de leur analogie structurale avec un métabolite cellulaire, ils agissent par inhibition compétitive et entraînent l'arrêt du métabolisme cellulaire. Les seconds sont aussi des dérivés chimiques, mais ils sont élaborés par des micro-organismes vivants (champignons, bactéries). Deux autres propriétés tendent à mieux les définir : ils agissent à des concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre *in vitro ;* ils interagissent d'une manière spécifique au niveau d'une structure d'une voie métabolique ou d'une enzyme, perturbant de ce fait la vitalité et inhibant la croissance microbienne.

Ces substances ont une action plus ou moins totale. On dit qu'elles sont **bactériostatiques** ou **fongistatiques** lorsqu'elles possèdent la propriété d'inhiber momentanément la multiplication des bactéries ou des champignons dans des conditions d'emploi définies. Elles sont dites **bactéricides** ou **fongicides** ou **virucides** lorsqu'elles détruisent totalement les bactéries, les champignons ou les virus dans des conditions d'emploi définies.

1.2. Action antimicrobienne

Un micro-organisme seul (un individu au sein d'une population) ne peut se trouver que dans deux états : la vie ou la mort (incapacité de se reproduire). On peut donc dire que la destruction d'un micro-organisme est un phénomène de tout ou rien. En revanche, une population de micro-organismes mise au contact d'un agent antimicrobien comporte, au début uniquement, des micro-organismes vivants, puis un mélange de micro-organismes vivants (les survivants) et de micro-organismes tués. Leur destruction ne sera en aucun cas instantanée.

La cinétique de la destruction bactérienne suit un certain nombre de lois. Quel que soit le type de micro-organisme (bactérie, spore, champignon, virus) et le mode de destruction (chaleur, radiations UV et radiations ionisantes, agents désinfectants), celle-ci obéit aux mêmes règles. Ces lois seront étudiées dans le cas du traitement par la chaleur (voir § 2.1).

1.2.1. Facteurs influençant l'action antimicrobienne

L'action antimicrobienne dépend :
- du micro-organisme lui-même ;
- de l'agent antimicrobien ;
- de l'environnement où se situe l'action.

1.2.1.1. Micro-organisme

Une espèce bactérienne, par exemple, présente des sensibilités diverses vis-à-vis des agents antimicrobiens. Il est utile, au cours des infections, de définir une liste de produits actifs sur l'espèce responsable ; ce sera l'**antibiogramme** dans le cas de l'étude des antibiotiques.

Les *Streptococcus* β-hémolytiques sont ainsi des espèces régulièrement sensibles à de nombreux antibiotiques et qui le sont restées au cours des années. Des genres voisins, comme les *Staphylococcus*, sensibles au début de l'utilisation des antibiotiques (pénicilline), ont évolué vers la résistance. Ce phénomène est lié à la sélection de souches résistantes au cours des traitements thérapeutiques. Les mycobactéries (bacille tuberculeux) ne sont sensibles qu'à quelques antibiotiques.

L'état physiologique influe sur la vitalité et sur la sensibilité. Les formes sporulées ont une résistance toute particulière aux agents physiques ou chimiques ; les virus exigent en général des conditions (concentration × temps) 10 fois plus fortes que pour les bactéries, les protozoaires 100 fois plus fortes. Dans une population bactérienne, il peut aussi exister des différences individuelles de sensibilité.

1.2.1.2. Agent antimicrobien

Pour chaque agent, on peut définir un **spectre d'activité**, c'est-à-dire la liste des espèces vis-à-vis desquelles il exerce son pouvoir bactéricide ou bactériostatique. Les désinfectants (formol, etc.) ou les antiseptiques (alcool, etc.) ont un spectre très large ; ils sont polyvalents. Les antibiotiques ont un spectre beaucoup plus étroit ; la pénicilline G n'agit que sur les bactéries à Gram positif (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, etc.).

Les facteurs qui vont influencer l'efficacité sont :
- l'**intensité** pour les agents physiques : plus la température ou plus la pression sera élevée, plus forte sera l'action ;

Copyrighted material

– d'autres procédés qui tendent à **éliminer** les microbes du milieu où ils se trouvent ; ce sont par exemple la centrifugation, la filtration.

– La classification la plus communément utilisée distingue :

- les agents physiques ;
- les agents chimiques ;
- les agents chimiothérapeutiques.

2. Agents physiques

2.1. Température

Lorsqu'elle est utilisée comme procédé de conservation, l'action de la température sur les micro-organismes peut avoir deux conséquences :

– la « stabilisation » : blocage ou ralentissement du développement microbien sans élimination de ceux-ci (réfrigération, congélation, pasteurisation) ;

– la « destruction » : élimination des micro-organismes (stérilisation, appertisation).

Le résultat obtenu va dépendre, entre autres, de l'intensité de la température et donc de ses effets sur la vie cellulaire du micro-organisme. La *figure V.1* présente différents niveaux de température, les effets obtenus sur les micro-organismes et le nom des procédés utilisés.

2.1.1. Action de la chaleur

L'action de la température dépend de l'environnement, de l'état physicochimique des cellules et de leur nombre.

En solution aqueuse, la plupart des germes sous leur forme végétative sont rapidement tués à la température de 100 °C. En revanche, dans un milieu déshydraté, ils sont beaucoup plus résistants. C'est le cas, par exemple, des préparations huileuses ou des suspensions dans lesquelles les lipides thermostables protègent efficacement les micro-organismes. La stérilisation dite « à sec » des poudres solides, des objets, du matériel en verre ou en métal exige une température voisine de 180 °C qui détruit en même temps toutes les matières organiques.

Les formes végétatives des bactéries sont en général inactivées par un chauffage de 50 à 60 °C durant 30 minutes. Les formes sporulées sont au contraire, et par nature, extrêmement thermorésistantes. Dans la plupart des cas, seuls une température supérieure à 100 °C et un temps de contact de plusieurs dizaines de minutes assureront leur disparition.

Le troisième facteur est le nombre de cellules présentes dans le milieu à stériliser (voir § 1.2.1.). Il faut aussi tenir compte de l'apparition éventuelle de formes thermorésistantes : dans une population homogène, un chauffage prolongé tend à les sélectionner. Plus le nombre de bactéries est élevé initialement, plus nombreuses sont les cellules thermorésistantes et plus grandes sont les difficultés de les faire disparaître.

2.1.2. Inactivation thermique

2.1.2.1. Facteur « temps »

À une température constante donnée, suffisante pour exercer un effet destructeur, une population microbienne donnée évolue en fonction du temps de traitement. La décroissance est exponentielle (courbe $N = f(t)$, *fig. V.2*).

On peut exprimer la vitesse de décroissance :

$dN/dt = -k.N$ (signe – car N diminue).

En intégrant cette relation entre N_0 et N (N_0 : nombre initial de microbes présents, N nombre de microbes survivant au temps t), on peut écrire :

$$N = N_0.e^{-kt},$$

soit aussi :

$$\log N = \log N^0 - \frac{k.t}{2{,}3030}$$

est le coefficient directeur de la droite $\log N = f(t)$ *(fig. V.3)* est $-k/2{,}3030$, k est la constante de des-

Copyrighted material

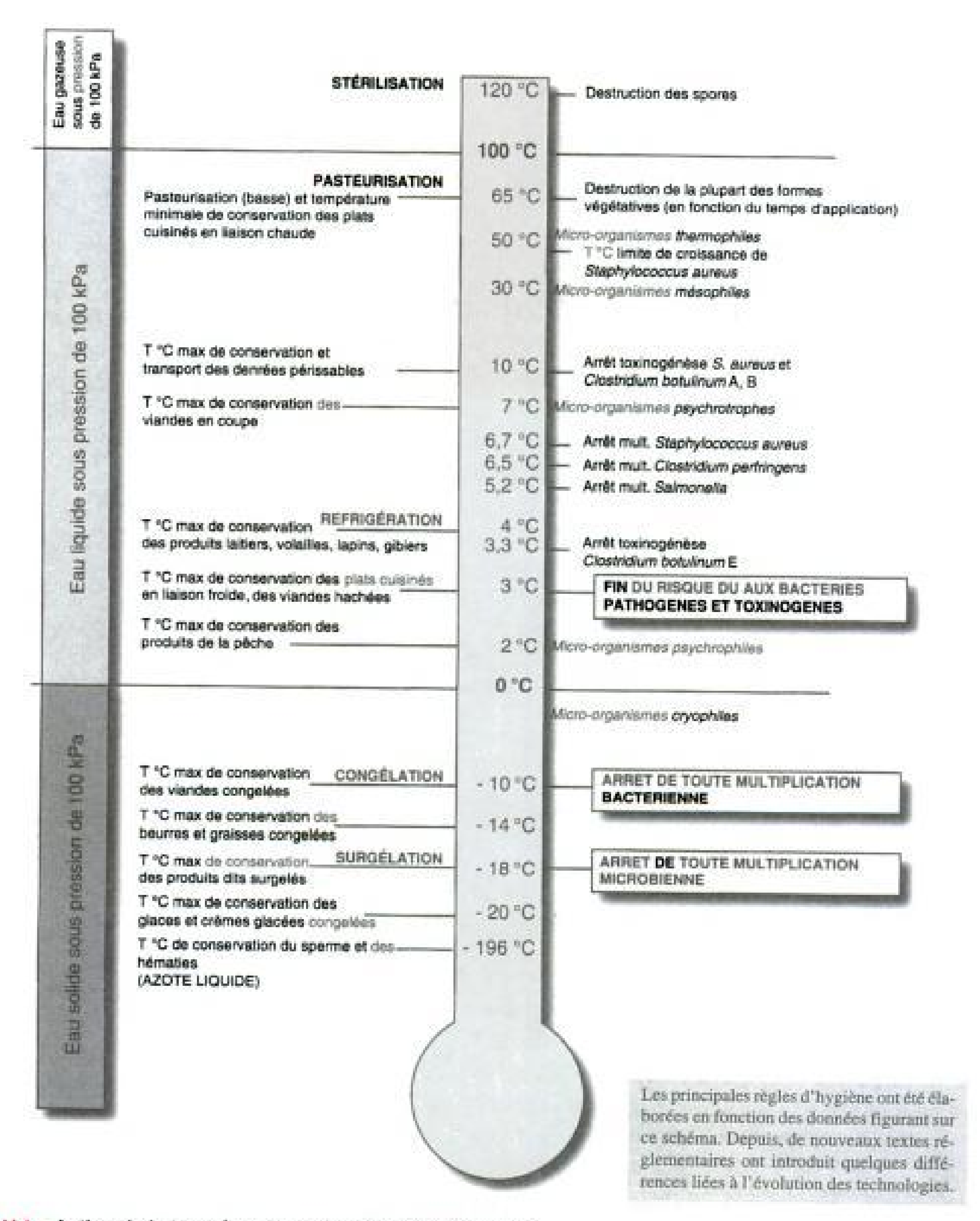


Figure V.1 – Action de la température sur les micro-organismes.

truction, elle dépend du microbe, de l'agent et des conditions d'applications.

On définit D, la **durée de réduction décimale**, comme le temps nécessaire pour réduire le nombre de microbes d'un facteur 10. Donc, lorsque $t = D$, on a $N = N_0/10$ et, donc :

$$\log N_0 - \log 10 = \log N_0 - (k/2{,}303).D,$$

soit :

$$D = 2{,}303/k.$$

On peut donc écrire :

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D}$$

et $\log (N/N_0) = -\frac{t}{D}$, représenté par la courbe $\log (N/N_0) = f(t)$ *(fig. V.4)*. La détermination graphique de D peut être réalisée sur cette courbe.

Copyrighted material

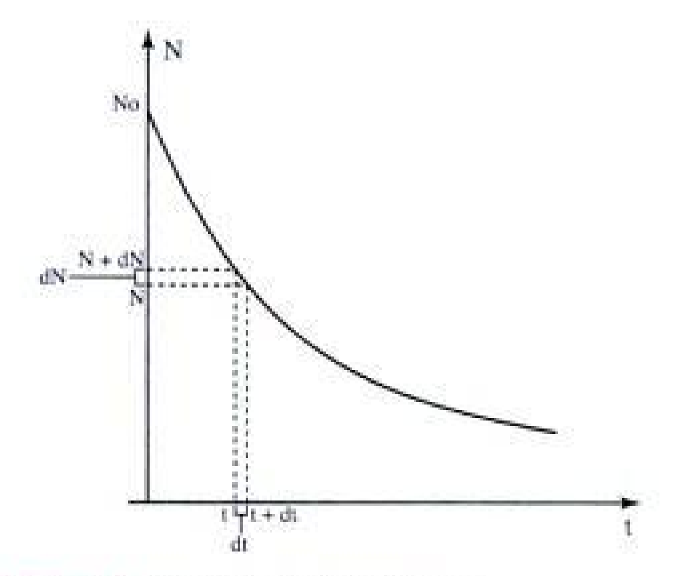


Figure V.2 – Cinétique de l'inactivation.

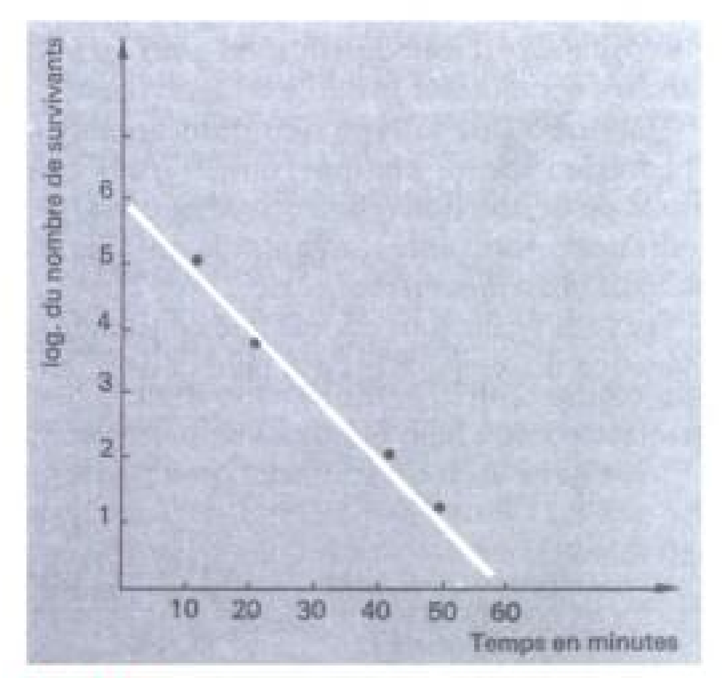


Figure V.3 – Action d'un agent antimicrobien en fonction de temps.

La mortalité est un phénomène de nature logarithmique.

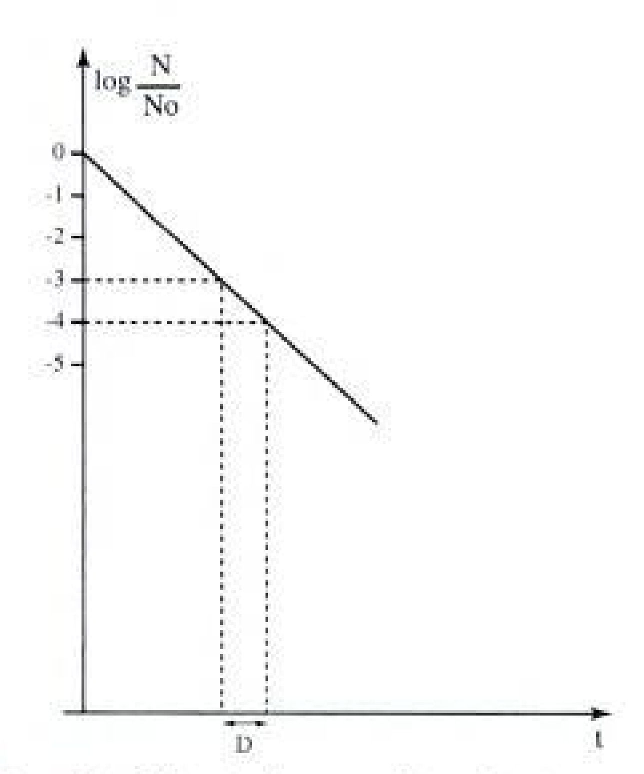


Figure V.4 – Détermination graphique du temps de réduction décimale.

Tableau V.1 – Valeurs de D et k pour *B. stearothermophilus* à différentes températures.

Température	D	K(min⁻¹)
115	15 min	0,15
121	1,5 min	1,5
127	9 sec	15,3
133	0,9 sec	153

La contamination initiale est divisée par 10 chaque fois que l'opération de destruction en cours est prolongée d'un temps D *(tab. V.1)*.

Le nombre initial de microbes est très important *(fig. V.5)* ; en effet, pour détruire complètement un nombre initial $N_n = 10^n$, on a besoin d'un temps de destruction $t = n.D$.

Par exemple, considérons un nombre de 10^6 bactéries contaminant un milieu donné. Admettons que toutes se trouvent dans le même état physiologique au moment où elles entrent au contact de l'agent antimicrobien. Si, au bout de 1 minute, 90 % de la population est détruite (soit D = 1 minute), il subsiste 10^5 germes. Au bout de 2 minutes, 90 % de la population restante doit être également détruite : il reste 10^4 germes. Au bout de 3, 4, puis 5 minutes, il subsiste respectivement 10^3, puis 10^2, puis 10 bactéries. Au bout de 6 minutes, la contamination sera de 1 bactérie et, au bout de 7 minutes, de 0,1 bactérie. Cela signifie qu'à la 7e minute, il y a 1 chance sur 10 pour que l'objet soit encore contaminé. À la 8e minute, il y en aurait encore 1 chance sur 100, et ainsi de suite. On n'est jamais sûr d'avoir détruit le dernier micro-organisme vivant, mais la probabilité de l'avoir détruit est de plus en plus grande lorsqu'on augmente la durée du traitement.

Copyrighted material

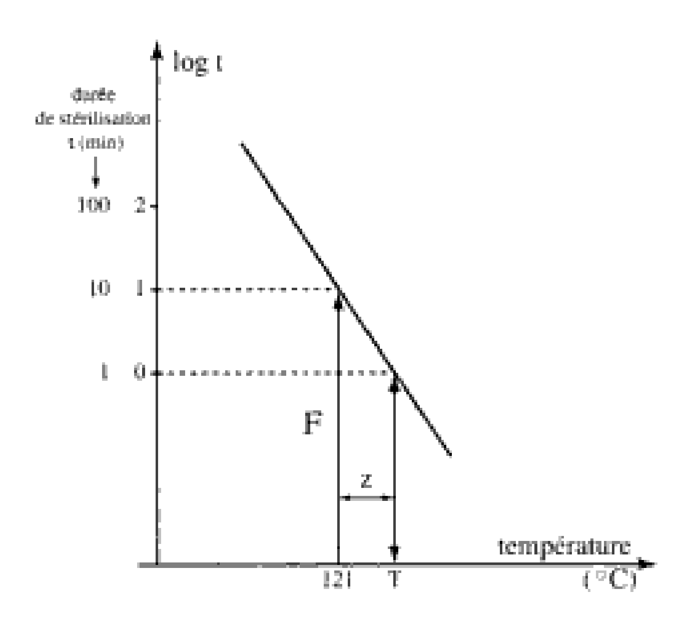


Figure V.6 – Relation température/durée de stérilisation.

Lorsqu'il y a formation d'amas de spores (conséquence d'un nettoyage insuffisant ou d'un état de surface avec des aspérités) ou une répartition non uniforme ou encore une résistance variable (présence de cellules jeunes végétatives plus sensibles que les cellules anciennes), la loi de destruction peut ne plus être linéaire (voir le calcul du barème dans l'industrie au § 2.1.3.6).

2.1.2.3. Autres facteurs

• Le **type de micro-organisme** influence la valeur de la durée de réduction décimale. Par exemple, pour *B. stearothermophilus*, $D_{121,1}$ = 3 minutes, pour *Cl. sporogenes*, $D_{121,1}$ = 1 minute, pour *Cl. botulinum*, $D_{121,1}$ = 0,21 minute, pour les germes non sporulés, $D_{121,1} = 5.10^{-8}$ minutes.

Remarque : la température de 121,1 °C (température standard de stérilisation) vient en fait de la conversion des degrés Fahrenheit (250 °F = 121,1 °C).

• Le **milieu** : il n'y a pas de règle générale ici, mais plus il est optimal pour le microbe cultivé, mieux la souche résiste au traitement thermique. On a cependant montré que la présence d'antiseptiques dans le milieu diminue la résistance thermique. Une concentration en sucre élevée, la présence d'extraits de levure, une concentration en sels augmentent la résistance. En ce qui concerne le pH, la résistance au traitement thermique est en générale optimale à pH 7, elle diminue très fortement à pH acide, moins à pH alcalin. En voici deux exemples :

– pour *B. natto* (traité à 100 °C, pH 7, et 10^7 spores·mL^{-1}), la durée maximum de traitement permettant la survie est de 10 minutes en présence de glucose à 5.10^{-5} %, de 16 minutes avec 5.10^{-4} %, de 18 minutes avec 0,01 % et de 20 minutes avec 0,1 % ;

– pour *Cl. sporogenes* (traité à 115 °C, 10^4 spores·mL^{-1}), la durée maximum de traitement permettant la survie est de 9 minutes à pH 5, de 15 minutes à pH 6, de 25 minutes à pH 7 et de 15 minutes à pH 8,2.

• L'**âge de la culture** traitée : en général, les formes végétatives sont moins résistantes quand elles se trouvent en phase exponentielle de croissance. Mais, là aussi, il existe une grande variabilité dans les résultats obtenus.

2.1.3. Procédés

Les procédés pratiques de traitements thermiques utilisent la chaleur humide ou la chaleur sèche.

2.1.3.1. Chaleur humide : stérilisation

C'est le confiseur Nicolas Appert qui, en 1785, a mis au point un procédé de conservation des légumes enfermés hermétiquement dans des bouteilles et plongés dans de l'eau bouillante. Pasteur, en 1801, montra que ce procédé détruisait les microbes contenus dans l'aliment. Cette technique, désormais connue sous le terme consacré d'« appertisation », utilise le principe de stérilisation par la chaleur humide, méthode très utilisée car fiable, efficace et simple d'emploi.

L'**autoclave** est une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression pour faire agir de la vapeur d'eau saturée. La stérilisation atteindra son but (par dénaturation des protéines) lorsqu'une température de 120 °C sera maintenue durant 15 à 20 minutes, à condition que l'atmosphère de l'autoclave soit saturante et débarrassée d'air. Il est donc très important de purger l'air qu'il contient.

Après l'autoclavage, il faut contrôler la stérilisation des produits biologiques et des milieux de culture. Il faut en particulier être très vigilant sur le conditionnement des produits (de grands volumes sont plus longs à stériliser que de petits) et sur la charge de l'autoclave.

2.1.3.2. Tyndallisation

Certains milieux liquides ou certaines substances ne peuvent supporter un tel traitement sans ris-

Copyrighted material

que d'altération. On procède alors à une **tyndallisation**. Cette opération, décrite par Tyndall, consiste à chauffer le milieu à 60 ou 70 °C durant 30 minutes ou 1 heure, 3 fois de suite à 24 heures d'intervalle. À cette température, toutes les formes végétatives sont détruites. Les spores thermorésistantes, dont la dormance est en général levée par le choc thermique, peuvent germer entre chaque intervalle de temps et se transformer en formes végétatives qui sont ensuite éliminées par les traitements successifs.

2.1.3.3. *Pasteurisation*

C'est à Pasteur que l'on doit le principe de cette méthode de conservation qui porte aujourd'hui son nom. Il découvrit (entre 1866 et 1876) qu'un chauffage modéré, ne dépassant pas 60 °C, était capable d'éviter certaines altérations du vin et de la bière en inhibant le développement des microbes qui les provoquent. Vers 1880, les Allemands puis les Danois appliquèrent cette méthode au lait.

Un peu plus tard, on s'aperçut que la pasteurisation pouvait permettre également la destruction des germes pathogènes fréquemment présents dans le lait ou ses dérivés. Le but de la **pasteurisation** est donc de détruire, par l'emploi convenable de la chaleur, la quasi-totalité de la flore banale, la totalité de la flore pathogène si elle existe (notamment le bacille tuberculeux) tout en laissant intacts les équilibres chimiques ainsi que les éléments biochimiques (vitamines notamment) du produit traité.

En France, le principe de la **pasteurisation obligatoire** des laits de grand mélange a été institué par la **loi du 2 juillet 1935**.

La pasteurisation ne peut être considérée comme une méthode de stérilisation. On l'applique à certains produits naturels dont on veut assurer momentanément la conservation sans en altérer les caractères organoleptiques (couleur, odeur, saveur) : le lait, la bière, le vin, les jus de fruits. On en distingue plusieurs types :

– la **pasteurisation haute température** ; le lait, par exemple, est porté à 90 °C durant 30 secondes par passage entre des plaques chauffantes, sous une faible épaisseur, puis brusquement refroidi à + 10 °C ;

– la **pasteurisation basse température** ; le lait est soumis à une température de 60 à 70 °C pendant un temps plus long (quelques minutes) ;

– la **pasteurisation UHT** (ultra-haute température) est un procédé récent surtout appliqué au lait et à certains jus de fruit pour obtenir une longue conservation. On applique une température de 140 °C pendant quelques secondes puis on refroidit brutalement. On obtient ainsi une stérilité presque parfaite, seules quelques spores de bactéries thermophiles pouvant rester viables (mais les conditions de conservation à température ordinaire ne permettront pas leur germination) ;

– l'**ébullition** peut être considérée comme une forme très courante de pasteurisation haute permettant de détruire le maximum de germes ; on l'utilise quotidiennement au cours de la cuisson des aliments.

Tous ces procédés permettent l'inactivation des micro-organismes pathogènes, même les plus résistants comme *M. tuberculosis* (sa destruction nécessite un chauffage modéré à 63 °C pendant 6 minutes ou à 72 °C pendant 6 à 8 secondes), mais ils ne stérilisent pas les milieux et ne détruisent pas, en particulier, les spores. Le lait pasteurisé doit répondre aux normes bactériologiques fixées par la législation (moins de 30 000 germes. L^{-1} de lait conditionné en récipients étanches et moins de 100 000 pour le lait pasteurisé vendu en vrac).

• **Application à l'industrie laitière**. La pasteurisation de la crème n'a été imposée que récemment de crainte de perdre les qualités organoleptiques spécifiques des beurres fabriqués dans les régions dites « de cru » (Charente, Normandie). Actuellement, la quasi-totalité du beurre français est fabriquée à partir de crème pasteurisée afin d'éliminer les germes de pollution qui s'y trouvent et qui pourraient provoquer ultérieurement des altérations du beurre.

Dans le traitement du lait, un chauffage modéré laisse subsister une bonne partie de la flore lactique afin d'empêcher le développement des germes indésirables. Dans le traitement de la crème, on cherche au contraire à se débarrasser de tous les germes dont le développement au cours de la maturation provoquerait la dégradation des constituants de la crème et entraverait l'action des fer-

Copyrighted material

ments lactiques purs, rajoutés après la pasteurisation. Un autre objectif de la pasteurisation est d'inactiver les enzymes responsables de certaines dégradations lors du stockage du beurre.

La pasteurisation du lait de fromagerie répond à plusieurs objectifs d'ordre hygiénique et d'ordre technique :

– assurer la qualité sanitaire du fromage ;

– en stoppant l'acidification par destruction de la flore lactique, permettre l'utilisation des laits dont la qualité bactériologique médiocre entraverait sérieusement la fabrication du fromage s'ils étaient utilisés crus.

Le lait est ainsi débarrassé de sa flore initiale à l'exception des sporulés. Il sera réensemencé avec des souches pures et sélectionnées qui permettent au fromager de travailler dans d'excellentes conditions de régularité.

2.1.3.4. Chaleur sèche

Pour certains matériels ou objets (verrerie, matériel chirurgical) qu'il n'est pas souhaitable ou possible de mettre au contact de la chaleur humide, on utilise la chaleur sèche. Elle est fournie par des fours électriques ou à gaz **(fours Pasteur, Poupinel)** à circulation d'air pour avoir une répartition homogène de la chaleur dans toute l'enceinte. La stérilisation (par dénaturation des protéines) sera effective en maintenant une température de 180 °C durant 30 minutes, de 170 °C pendant 1 heure ou de 160 °C durant 2 heures.

Au cours des manipulations de bactériologie qui ont pour objet d'isoler puis d'identifier les bactéries contenues dans un échantillon, toutes les opérations sont faites stérilement. Le matériel utilisé (öses, pipettes Pasteur) est stérilisé par flambage à la flamme d'un bec de gaz. L'efficacité de ce procédé est faible car les spores bactériennes nécessitent une exposition à la chaleur sèche de 1 seconde à 400 °C pour être détruites, condition souvent impossible à obtenir ici.

L'incinération peut être utilisée pour les objets combustibles à usage unique.

2.1.3.5. Contrôle de stérilité

Pour contrôler l'efficacité de la stérilisation (autoclave, four Pasteur, etc.), on met à profit les propriétés de thermorésistance des spores bactériennes : spores de *B. stearothermophilus* pour les contrôles en chaleur humide, de *B. subtilis* pour ceux en atmosphère sèche et les gaz, de *B. pumilus* pour les rayonnements ionisants. La méthode consiste à introduire dans le stérilisateur une certaine quantité de spores bactériennes sous forme de bandelettes de papiers imprégnées d'une suspension de spores ou d'ampoules qui contiennent à la fois les spores et le milieu de culture nécessaire à leur éventuel développement, puis de les soumettre au cycle de stérilisation. On teste la survie des spores par subculture : en l'absence de subculture (une première lecture est faite au bout de 24 à 48 heures, une seconde 5 jours après), la stérilisation est considérée comme réussie.

On peut aussi utiliser des bandelettes adhésives ou des tubes contenant des produits chimiques liquides changeant de couleur après stérilisation.

2.1.3.6. Barèmes de stérilisation et de pasteurisation

Les contaminants des objets sont de nature très diverse, chacun est défini par ses valeurs de D (réduction décimale) et de *z* (facteur de thermorésistance).

Pour être sûr d'obtenir un degré suffisant de destruction, il suffit d'imposer des conditions assurant la destruction des micro-organismes dont les spores sont les plus résistantes (valeurs de D et de *z* maximales). Pour l'action de la vapeur d'eau, c'est *B. stearothermophilus*. Il est caractérisé par une valeur de D à 120 °C voisine de 1,5 minute et une valeur de *z* voisine de 9,5 °C.

Dans un souci de simplification, comme 9,5 °C est très voisin de 10 °C, on a choisi comme référence un micro-organisme imaginaire un peu plus résistant au-delà de 120 °C que *B. stearothermophilus*. Les spores de ce micro-organisme seraient tuées 10 fois plus vite en augmentant la température de 10 °C (au lieu de 9,5 °C).

Un traitement stérilisant par la vapeur d'eau sera au moins 10 fois moins efficace à 110 °C qu'à 120 °C, 100 fois moins efficace à 100 °C qu'à 120 °C, mais 10 fois plus efficace à 130 °C qu'à 120 °C, etc.

2.1.3.6.1. Détermination de la durée de stérilisation

L'objectif recherché est une réduction des micro-organismes de telle façon que l'on obtienne un ris-

Copyrighted material

que de survie de 10^{-6} au maximum (pour des produits pharmaceutiques).

Il faut donc savoir quelle est la contamination initiale du milieu que l'on veut stériliser. Dans la pratique, on supposera qu'elle pourrait être de 10^6 spores par objet nettoyé de manière efficace (faute de la connaître précisément).

Pour faire passer la population de 10^6 à 10^{-6} (donc la diviser par 10^{12}), il faut maintenir la température de stérilisation de 120 °C pendant 12 fois 1,5 minute, soit 18 minutes.

Il convient cependant de prendre en compte une marge de sécurité en supposant que l'autoclave (supposé avoir ici une contenance de 100 litres) est entièrement rempli de spores, soit 10^{10} spores par litre.

Pour faire passer la charge microbienne totale du stérilisateur de 10^{12} à 10^6, il faudrait donc la diviser par 10^{-18}, c'est-à-dire maintenir la température de stérilisation de 120 °C pendant 18 fois 1,5 minute, soit 27 minutes.

De plus, dans les stérilisateurs modernes maintenus en bon état de fonctionnement, la température dans la charge n'est jamais inférieure de plus de 3 °C à celle indiquée par le régulateur. En prenant le cas le plus défavorable, c'est-à-dire un point froid de 117 °C, et comme l'efficacité à 117 °C est la moitié de l'efficacité à 120 °C, il faut compter 2 fois plus de temps pour avoir le même effet stérilisant.

On obtient donc un temps de stérilisation de 2 fois 27 minutes, soit 54 minutes, que l'on peut arrondir à 60 minutes à la température de 120 °C. Le même raisonnement s'applique aux autres modes de traitement.

Nous avons également vu (§ 2.1.2.2.) qu'il existait une relation linéaire entre le logarithme de la durée du traitement et la température. Nous avons défini F, « valeur stérilisatrice » (« pasteurisatrice ») et *z*, « facteur de thermorésistance ». Ces deux paramètres sont reliés mathématiquement :

$$F = t.10^{(\theta - \theta^*)/z}$$

T* étant la température « standard » de traitement ; 121,1 °C en stérilisation, 60 °C en pasteurisation.

Cette relation permet de calculer la durée de traitement à appliquer pour une température différente de la température standard et pour avoir la même efficacité, le même résultat (même F). Elle permet également de savoir quelle sera la valeur stérilisatrice (pasteurisatrice) obtenue si l'on modifie la durée de traitement en utilisant la même température.

2.1.3.6.2. Cas de la pasteurisation

Pour ne pas trop altérer leurs propriétés nutritives et organoleptiques, les produits alimentaires (lait, plats cuisinés) sont portés, au cours de leur préparation, à des températures de pasteurisation inférieures aux températures de stérilisation. Sous réserve que les produits ne soient pas recontaminés et que leur conservation se fasse à + 3 °C, leur durée de vie sera fonction de la valeur **pasteurisatrice** appliquée. Par l'application d'une valeur pasteurisatrice au moins égale à 100, la durée de vie du produit est de 21 jours.

Les notions précédentes relatives à la valeur stérilisatrice sont en partie applicables à la valeur pasteurisatrice. On définit ainsi le temps de réduction décimale D et le facteur de thermorésistance *z*. Le germe de référence retenu est un entérocoque *(Str. faecalis)*.

2.1.4. Action du froid

Le recours au froid s'effectue soit en restant à température positive, c'est la **réfrigération** (température légale : + 4 °C), soit en passant dans la zone négative, c'est la **congélation** (température légale : – 10 °C). En réfrigération, l'eau de constitution reste liquide (l'Aw de la denrée, qui reste importante, permet éventuellement le développement des germes psychrophiles), alors qu'en congélation, une grande partie devient solide (l'Aw devient faible).

Les trois règles à respecter dans l'application du froid ont été précisées dès 1934 par Alexandre Monvoisin et sont connues aujourd'hui sous la dénomination « trépied frigorifique de Monvoisin ». Ce sont les suivantes :

– réfrigération appliquée à un aliment sain ;
– réfrigération précoce ;
– réfrigération continue (notion de chaîne du froid avec ses « maillons »).

Pratiquement, seuls les germes superficiels peuvent évoluer. Leur multiplication est d'autant plus lente que la température est basse.

Copyrighted material

La multiplication des germes susceptibles de provoquer des intoxications s'exerce surtout au voisinage de 37 °C. Les températures d'inhibition des germes pathogènes sont en général supérieures à 3 °C (Staphylocoque toxinogène : 10 °C, *Cl. botulinum* A et B : 10 °C ; Salmonelles : 5 °C, *Cl. botulinum* E : 3,3 °C).

La congélation agit de plusieurs manières sur la flore microbienne des germes :

– réduction de la vitesse de multiplication ;

– transformation de l'eau en glace, diminuant la quantité d'eau disponible ;

– altérations de la structure (perforation, dénaturation des protéines) ou du métabolisme des germes provoquées par le changement d'état de l'eau en glace.

La congélation n'a pas un réel effet bactéricide ; elle réduit certes la population microbienne initiale mais dans une faible proportion. Pour les micro-organismes les plus sensibles (à Gram négatif), la population est réduite d'une puissance de 10 par la congélation (soit une destruction de 90 %) et d'une autre puissance de 10 au cours d'un stockage prolongé en congélation. Si la population microbienne est importante au moment de la congélation, elle le sera donc encore après stockage et décongélation. La **surgélation** est une congélation dont la température légale est de – 18 °C.

2.2. Radiations

Le rayonnement solaire ou, plus précisément, les radiations ultraviolettes sont de précieux agents naturels de stérilisation : l'absence de micro-organismes à la surface des eaux est due précisément à l'irradiation solaire. Les principaux types de radiations sont électromagnétiques, électroniques et soniques.

2.2.1. Radiations électromagnétiques

Elles sont caractérisées avant tout par leur longueur d'onde. Leur action sur les micro-organismes revêt un double intérêt : d'une part, parce qu'elles sont stérilisatrices, leur utilisation permet la conservation des aliments par exemple, et, d'autre part, la connaissance de leur mode d'action sur les bactéries peut être transposée à celui qu'on observe sur les cellules humaines. Nous vivons à une époque où les recherches spatiales obligent l'homme à entrer en contact avec de nombreux types de rayonnements et il est utile d'en connaître les effets pour éventuellement les prévenir.

La quantité d'énergie cédée par un rayonnement à un organisme vivant est d'autant plus élevée que la longueur d'onde est plus petite. Les premiers rayonnements connus par leur activité sont les **ultraviolets** ($\lambda \leq 400$ nm). Ce sont aussi les moins efficaces puisque leur longueur d'onde est grande. Viennent ensuite les **rayons X** et les **rayons gamma** ($\lambda < 10$ nm) qui libèrent une énergie plus importante et qui pénètrent aussi plus profondément dans la matière. Les rayonnements agissent essentiellement au niveau de l'ADN soit par modification des bases pyrimidiques (dimérisation TT par exemple), introduisant ainsi des mutations souvent létales, soit par formation de radicaux libres provoquant des cassures et des modifications chimiques de l'ADN.

• **Rayons UV**. Ils sont le plus utilisés malgré leur faible rendement. La région la plus active de leur spectre d'émission est située entre 260 et 270 nm. C'est dans cette zone qu'émettent les lampes germicides destinées à la stérilisation des salles chirurgicales, de certaines enceintes de laboratoire, ou encore à la décontamination des surfaces de travail (tables, paillasse, etc.), des objets… On a voulu également les employer pour la stérilisation des eaux. D'une façon générale, les résultats acquis montrent que les rayonnements UV n'ont qu'une efficacité limitée : dans l'eau limpide, ils agissent sur une épaisseur de quelques millimètres seulement. Leur pénétration est arrêtée par la moindre particule de matière en suspension.

• **Autres radiations**. Les autres radiations (X et γ) sont sans doute beaucoup plus efficientes parce que douées d'un pouvoir de pénétration plus intense. C'est la raison pour laquelle on a voulu les considérer comme un moyen idéal de stérilisation « à froid » des conserves alimentaires. Des difficultés majeures subsistent pourtant : les installations qui permettent leur production sont coûteuses ; l'irradiation ne peut pas être dirigée que sur le seul objet à stériliser ; et, surtout, ce sont des radiations ionisantes qui ont un effet direct

Copyrighted material

non seulement sur les micro-organismes, mais aussi sur les substances environnantes qu'elles peuvent endommager ou détruire.

Industriellement, on distingue :

– la **radappertisation** : application de doses de radiations suffisantes pour réduire le nombre ou l'activité des micro-organismes vivants, de façon à ce qu'ils ne soient plus décelables par aucune méthode microbiologique (doses d'irradiation comprises entre 20 et 50 kGy [kilo Gray]) ;

– la **radicidation** : application de doses de radiations ionisantes suffisantes pour que le nombre de micro-organismes pathogènes non sporulés soit réduit de façon à ce qu'aucun d'entre eux ne puisse être détecté par une méthode microbiologique standard (doses égales ou inférieures à 10 kGy) ;

– la **radurisation** : application de doses de radiations ionisantes n'altérant pas le produit et réduisant sensiblement sa charge microbienne en vue d'augmenter sa durée de vie commerciale.

Le traitement ionisant peut s'appliquer à des aliments emballés. C'est une autre façon de **stabiliser** les aliments.

• **Micro-ondes**. Les micro-ondes sont également une forme de radiations électromagnétiques (de longueur d'onde se situant entre 1 mm et 1 m, de 12 cm soit une fréquence de 2,45 GHz pour les fours domestiques). Les fours à micro-ondes ne peuvent chauffer que des produits qui absorbent les ondes (comme l'eau ou les graisses). Ils risquent d'être détruits si on y place des métaux. Les micro-ondes ne peuvent être utilisées ni pour stériliser du matériel (qui reste froid) ni des liquides puisque, dans ce cas, on ne peut dépasser la température de 100 °C (on n'obtient donc qu'une pasteurisation).

2.2.2. Radiations électroniques

Une émission continue d'électrons lancés à grande vitesse a un pouvoir de stérilisation identique à celui des rayons. Les électrons peuvent être dirigés à volonté sur le point que l'on désire atteindre, mais leur pouvoir de pénétration est nettement plus faible que celui des rayons γ. Leur principal défaut est surtout l'altération des substances organiques soumises à leur action.

2.2.3. Radiations soniques

Nous les citerons pour mémoire car, jusqu'à présent, elles n'ont pas fait l'objet d'applications pratiques. Les ultrasons ont le pouvoir de tuer les micro-organismes en suspension dans un liquide en libérant leur contenu endocellulaire.

2.3. Pression

Les fortes pressions **(ultrapressions)** sont capables de détruire les micro-organismes. Elles sont couramment utilisées en recherche pour faire éclater les cellules bactériennes. Il y a un siècle, Bert et Regnard montraient que le traitement à 4 000 bars des viandes, des fruits et du lait permettait de réduire sensiblement leur teneur en micro-organismes.

L'énorme dépense d'énergie nécessitée en limite l'usage industriel. Cependant, leur utilisation comme procédé de conservation des aliments commence à prendre une grande importance. C'est seulement depuis 1986 que des produits « haute pression » *(high pressure)* commencent à être mis sur le marché (confitures, jus de fruits, desserts lactés). Les hautes pressions agissent sur les réactions chimiques de façon douce, elles provoquent la dénaturation des protéines, le passage à l'état solide des lipides et la gélification, mais elles ne dégradent pas les petites molécules (vitamines, arômes). À partir de 3 000 bars, les formes végétatives sont détruites, seules les spores résistent jusqu'à 10 000 bars. Ces dernières années, au Japon en particulier, de nombreuses techniques de **pascalisation**, associant souvent l'action de la température à celle des hautes pressions, se sont multipliées : confitures et jus de fruits pasteurisés à basse température puis traités de 10 à 30 minutes sous 3 500 à 6 000 bars, conservation d'aliments à des températures négatives sans formation de glace grâce à un traitement haute pression (l'eau restant liquide à – 20 °C sous 2 000 bars).

Pour la conservation de certains aliments comme les confitures ou les salaisons, on a recours à la **pression osmotique**, procédé ancestral. L'effet antimicrobien est obtenu par l'augmentation de la pression osmotique par addition de sucre ou de sel, les espèces capables de se développer aux concentrations choisies (**osmophiles** pour les fortes teneurs en sucre ou **halophiles** dans le cas du sel) sont en effet très peu nombreuses. Le **séchage** des aliments est aussi un procédé de conservation fondé sur l'augmentation de la pression osmotique mais aussi sur la diminution de l'Aw (les espèces **xérophiles** sont relativement peu nombreuses et souvent non pathogènes).

2.4. Élimination mécanique

Deux procédés mécaniques permettent d'éliminer les micro-organismes d'un milieu liquide où ils sont en suspension : la filtration et la centrifugation.

2.4.1. Filtration

C'est le procédé de choix qui offre aujourd'hui d'excellentes garanties quant à la rétention abso-

Copyrighted material

lue des micro-organismes pour stériliser les solutions renfermant des substances thermolabiles, telles les protéines qui ne supportent pas des températures inférieures à 100 °C (sérum, liquide d'ascite, etc.). La filtration stérilisante est également appelée « stérilisation à froid ». Il faut choisir le milieu filtrant le mieux adapté pour assurer un bon rapport efficacité/coût du traitement. Des matériaux filtrants divers ont été préparés dans ce but. Le plus ancien est le filtre Chamberland ou la **bougie filtrante** qui utilise les propriétés de la porcelaine non vernissée. Actuellement, on a recours soit aux filtres de **verre fritté**, constitués d'un mélange de deux poudres de verre aux points de fusion et à la granulométrie différents, soit aux **filtres de diatomées** (filtres Berkefeld), soit enfin aux **membranes filtrantes** d'acétate de cellulose appelées encore filtres moléculaires, de porosité graduée (les filtres en **fibres d'amiante** sont actuellement interdits). Les membranes filtrantes ont d'autres applications que celles de la stérilisation. Elles permettent en effet de retenir les micro-organismes contenus dans un liquide et, en même temps, de les isoler. Quand on dépose une telle membrane sur un milieu convenable, les bactéries se développent, forment des colonies que l'on peut ensuite étudier et identifier.

2.4.2. Centrifugation

La centrifugation est également capable de séparer les particules en suspension dans un milieu liquide. Les bactéries peuvent être éliminées grâce à des appareils de type courant permettant une accélération de l'ordre de 5 000 g. Il s'agit d'un procédé inutilisable en tant que moyen général de stérilisation. Il s'applique habituellement à de faibles quantités de liquide et ne permet pas une élimination totale des micro-organismes. Pourtant, une importante application en est faite dans certaines industries laitières pour le traitement du lait avant sa pasteurisation. C'est le procédé dit de **bactofugation**, qui consiste à centrifuger le lait pour en éliminer la plus grande partie des micro-organismes. Il permet à la pasteurisation, qui intervient ensuite, d'agir avec le maximum d'efficacité.

3. Agents chimiques

Les agents antibactériens chimiques ne peuvent pas tous servir de désinfectants ou d'antiseptiques. Certains, comme les cyanures, sont de redoutables poisons dont la toxicité élevée interdit l'emploi.

Le choix de ces agents dépendra de l'usage que l'on veut en faire. Il n'existe pas en effet d'agent idéal capable d'agir aussi efficacement dans tous les cas. Certains sont très actifs mais toxiques pour les tissus, donc utilisables pour les seuls objets inanimés. D'autres ont un pouvoir de pénétration élevé ; ils sont solubles mais instables. D'autres encore sont rapidement inactivés au contact des matières organiques. D'autres, enfin, peuvent être corrosifs ou teinter les corps avec lesquels ils entrent en contact, engendrer une odeur ou un aspect désagréables *(tab. V.4)*. Le désinfectant ou l'antiseptique idéal devrait donc posséder tout un ensemble de qualités difficiles à réunir la plus importante serait un spectre antibactérien étendu (Gram positif, Gram négatif, mycobactéries), de nature bactéricide, associée à une action fongicide, sporicide et virucide. En fait, il n'existe pas encore.

Le *tableau V.3* donne le spectre d'activité des principaux antiseptiques et désinfectants.

L'arrêté du 25 septembre 1985 relatif aux produits destinés au nettoyage des matériels pouvant se trouver au contact des denrées alimentaires précise la liste des molécules susceptibles d'être utilisées, de même que les molécules entrant dans la catégorie des agents de surface cationiques.

3.1. Mode d'action

L'activité des agents chimiques vis-à-vis des micro-organismes peut s'exercer selon des modalités extrêmement diverses. L'action est brutale et non spécifique (à la différence des antibiotiques). Cependant, il est possible de généraliser et d'établir un certain nombre de schémas qui rassemblent à peu près tous les mécanismes actuellement connus.

La fixation est un phénomène de nature chimique ou électrique qui a lieu entre la paroi bacté-

Copyrighted material

Tableau V.3 – Spectre d'activité antimicrobienne des antiseptiques et désinfectants.

Désinfectants et antiseptiques	Bactéries à Gram		Mycobactéries	Spores	Champignons	Virus
	Positif	Négatif				
Alcool à 70°	++	++	0	+	+	+
Aldéhydes	+++	+++	++	+	+++	++
Ammoniums quaternaires	+++	+ inactif sur les pseudomonas	0	0	+	+
Carbanilides	+	0			0	
Chlorhexidine	+++	++	0	0	+	0
Chlore	+++	+++	++	++	++	++
Hexachlorophène	+++	+	0	0	+	0
Iode	+++	+++	++	++	++	++
Dérivés mercuriels	++	++	0	0	+	
Phénoliques	Activité variable selon les composés					

Tableau V.4 – Incompatibilités et accidents lors de l'utilisation des antiseptiques et désinfectants.

Antiseptiques et désinfectants	Inactivation Incompatibilités d'emploi	Accidents
Alcool	Matières organiques	
Aldéhydes	Matières organiques Solution instable	Irritants
Ammoniums quaternaires	Matières organiques Détergents anioniques Eaux dures Polysorbates, phospholipides	Hypersensibilisation cutanée et muqueuse
Carbanilides		Photosensibilisation Production d'aniline par chauffage du trichlorocarbanilide (méthémoglobinémie du nouveau-né)
Chlore	Matières organiques	Corrosion des métaux Irritant
Chlorhexidine	Matières organiques et liège Détergents anioniques	Hypersensibilisation cutanée
Iode	Matières organiques	Irritant
Dérivés mercuriels	Matières organiques Plastiques et caoutchouc	Toxicité tissulaire par accumulation Dermite par sensibilisation
Phénoliques	Matières organiques Plastiques et caoutchouc (adsorption)	Irritants Toxicité nerveuse (hexachlorophène)

Copyrighted material

rienne et le désinfectant en fonction de la concentration et du mouvement brownien. Il entraîne souvent une modification de la charge électrique des bactéries (c'est le cas des ammoniums quaternaires). La pénétration de l'agent chimique à travers la paroi puis la membrane est fonction de sa solubilité, de son ionisation ou de son encombrement stérique.

3.1.1. Oxydation et dénaturation des protéines

Les agents oxydants comme l'eau oxygénée et les dérivés halogénés oxydent les groupements SH libres des enzymes et les altèrent irréversiblement.

Les sels des métaux lourds comme le mercure et ses dérivés organiques ou inorganiques se combinent avec ces mêmes groupements SH et les inactivent.

Les alcools agissent d'une façon comparable à celle de la chaleur en coagulant les protéines.

3.1.2. Altération de la membrane cytoplasmique

L'altération de la structure de la membrane cytoplasmique entraîne une fuite de substance, une désorganisation du métabolisme, la dégénérescence de la cellule et, finalement, sa mort. Les agents liposolubles sont les plus directement actifs puisque la membrane n'est autre qu'une barrière lipoprotéinique. Tels sont les composés phénoliques, les savons et surtout les détergents.

3.1.3. Action sur le métabolisme

Les cyanures et les fluorures sont de véritables poisons respiratoires, inutilisables en tant qu'agents antiseptiques. Les colorants basiques (bleu de méthylène, violet de gentiane) réagissent au contact des acides ribonucléiques présents en abondance dans le cytoplasme. Les combinaisons ainsi générées inactivent toutes les fonctions de la bactérie. D'autres agents sont mutagènes (acridine et dérivés) ou chélateurs (dérivés de la quinoléine).

Des faits récents ont malheureusement prouvé que les germes pouvaient acquérir une résistance secondaire aux antiseptiques. Des plasmides transférables, responsables d'une résistance acquise à la fois à certains antibiotiques et aux sels de mercure, d'argent ou d'arsenic, ont été isolés.

3.2. Classification

Il est possible de définir un certain nombre de groupes d'agents désinfectants ou antiseptiques sur la base de leur parenté chimique et de leur mode d'activité précédemment définis. Seuls les plus courants seront décrits.

3.2.1. Oxydants

3.2.1.1. Eau oxygénée

L'eau oxygénée et tous les composés susceptibles de donner naissance à de l'eau oxygénée (perborates et persulfates alcalins) sont des antiseptiques efficaces. L'eau oxygénée à 3 % en solution aqueuse est un désinfectant des plaies, mais sa décomposition rapide au contact des tissus limite son efficacité. D'autres composés comme le permanganate de potassium et l'acide peracétique agissent de la même façon en libérant de l'oxygène natif.

3.2.1.2. Chlore et dérivés

Le chlore, sous forme de gaz ou de diverses combinaisons chimiques, est un des antiseptiques les plus communs. Il est universellement employé pour la stérilisation des eaux de boisson et des eaux de piscine, pour le traitement des eaux polluées, pour la désinfection des locaux et des objets contaminés. Il est encore, à ce jour, le plus utilisé dans l'industrie alimentaire. Il s'emploie en milieu alcalin (pH > 8) de manière à éviter les corrosions toujours dangereuses avec un tel oxydant *(tab. V.5)*.

Sous **forme gazeuse**, le chlore est un produit dangereux, de manipulation délicate. Ses composés liquides, les **hypochlorites** et les **chloramines**, sont plus répandus. L'hypochlorite de calcium ou chlorure de chaux est un mélange d'hypochlorite, de chlorure et d'hydroxyde de calcium. L'hypochlorite de sodium, mieux connu sous le nom d'**eau de Javel**, titre de 10 à 20° chlorométriques (le degré chlorométrique exprime le nombre de litres de chlore dégagés par kilogramme de produit). Avec

Copyrighted material

tence de plasmides de résistance aux métaux lourds, qui vient d'être reconnue chez les bactéries au cours des dernières décennies, peut constituer dans l'avenir une certaine entrave à leur utilisation.

3.2.4. Phénols

Les composés phénoliques jouissent de propriétés bactériostatiques ou bactéricides marquées grâce à leur fonction phénol par une inhibition des systèmes enzymatiques ou par un découplage des réactions énergétiques. Cela se traduit par une dénaturation de la membrane cytoplasmique entraînant une fuite des constituants cellulaires.

Désinfectant autrefois extrêmement répandu et populaire, le phénol est maintenant remplacé par des antiseptiques moins caustiques. Les phénols sont irritants pour la peau et les muqueuses respiratoires et oculaires. Ils ont un effet allergisant et photosensibilisant. Bactéricides et fongicides, ils sont peu actifs sur les formes sporulées. Leur activité virucide est discutée. L'action, favorisée en présence de sels de sodium ou de potassium, est inhibée en présence de soude et considérablement atténuée par les matières organiques *(fig. V.8)*.

3.2.5. Aldéhydes

L'activité des aldéhydes (formique, glutaraldéhyde, etc.) est liée à la dénaturation des protéines et des acides nucléiques par réduction chimique. Les aldéhydes détruisent très bien les bactéries et les champignons. Ils ont une excellente action virucide.

Ce sont d'excellents produits pour désinfecter les surfaces mais également les instruments et les appareils (glutaraldéhyde à 2 %). On peut les utiliser seuls ou associés à un détergent (cependant, leurs vapeurs sont très toxiques, voir chap. IX).

3.2.6. Chlorhexidine

La chlorhexidine fait partie des biguanidines. C'est un produit insoluble dans l'eau et de caractère basique. Bactéricide ou seulement bactériostatique selon sa concentration, elle agit sur les bactéries à Gram positif et négatif.

3.2.7. Salicylanilides et carbanilides

Les dérivés bromés des salicylanilides sont les plus utilisés. Ils agissent surtout sur les bactéries à Gram positif. Leur toxicité est faible mais des phénomènes de photosensibilisation sont très fréquents lors de leur usage régulier sous forme de savons.

Parmi les carbanilides, c'est le dérivé trichloré qui est le plus utilisé. Son activité est limitée aux bactéries à Gram positif. Sa toxicité est faible et il est bien toléré aux concentrations usuelles rencontrées dans les savons.

3.2.8. Savons et détergents synthétiques

Les savons sont des sels sodiques ou potassiques d'acides gras de poids moléculaire élevé : acide oléique, linoléique, ricinoléique. Leur pouvoir antiseptique varie avec les espèces microbiennes. Leur action est avant tout mécanique. Ils réduisent les forces de tension superficielle et augmentent le pouvoir mouillant de l'eau : les germes sont emprisonnés dans la mousse comme dans un réseau, puis éliminés par le rinçage. Certains, comme le ricinoléate de sodium, jouissent de propriétés antiseptiques propres et sont utilisés en hygiène buccopharyngée.

À côté de ces savons alcalins, d'autres composés à pouvoir mouillant, plus récemment synthétisés, sont largement commercialisés en raison de leur action bactéricide parallèle. Ce sont les détergents, encore appelés **surfactants**. Chimiquement, ils se divisent en trois catégories :

– les **détergents anioniques**, chez lesquels le groupement anionique est actif ;

– les **détergents cationiques**, à groupement cationique actif ; les plus importants sont les ammoniums quaternaires *(fig. V.9)* ;

– les **détergents non ioniques**, sans grand intérêt puisqu'ils ne possèdent aucune activité antimicrobienne.

L'activité des surfactants anioniques est modérée. Ils sont utilisés surtout pour renforcer l'action d'autres antiseptiques en favorisant leur dissolution et leur pénétration, d'où certaines associations comme le Merceryl laurylé®, mélange de laurylsulfate de sodium et de mercurobutol.

Copyrighted material

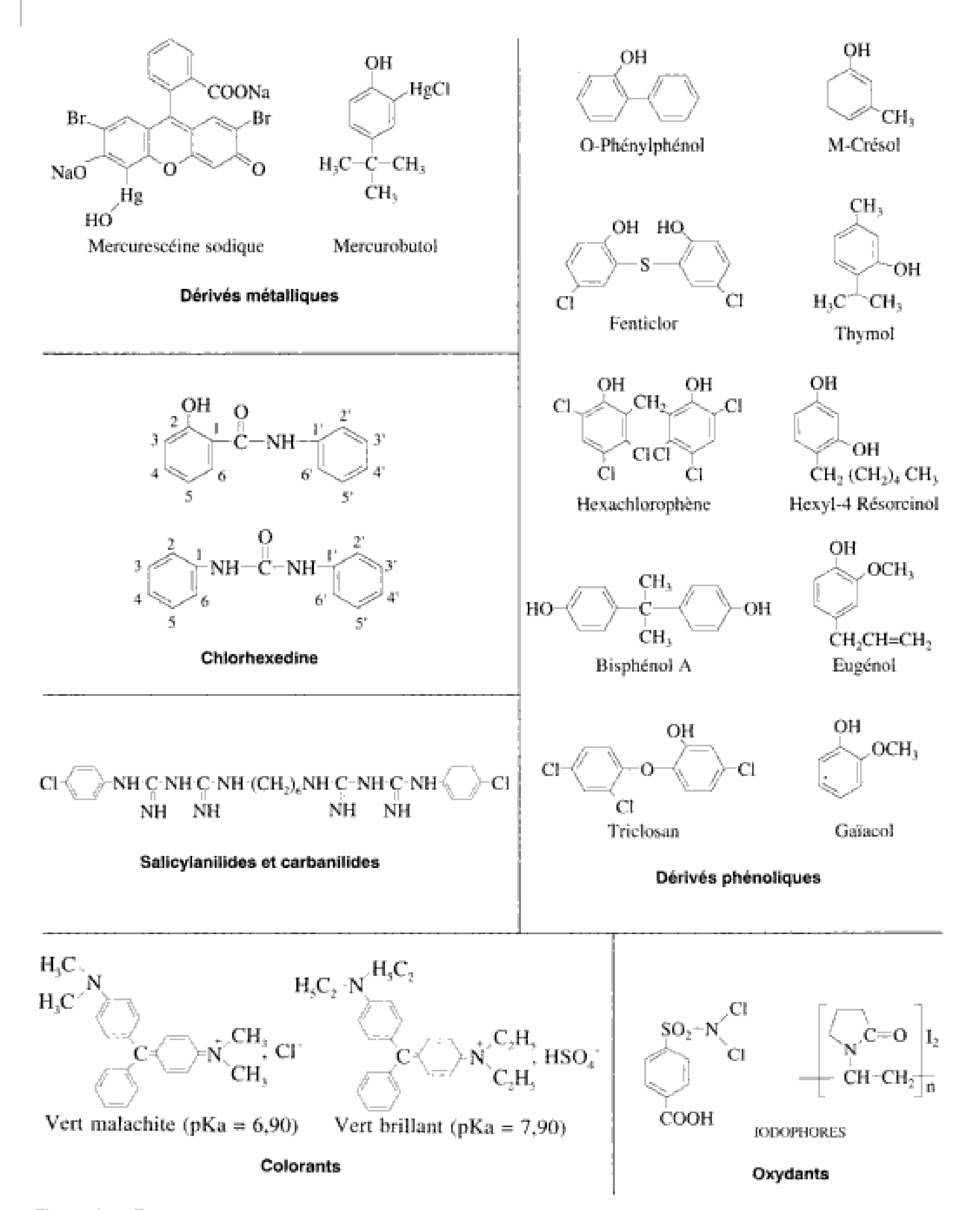


Figure V.8 – Formules de quelques agents antimicrobiens.

Copyrighted material

R_1, R_2, R_3, R_4 autour de $N^+ \cdots X^-$

Formule générale
R_1, R_2, R_3, R_4 : chaîne carbonée

X = halogène, sulfate…

Bromuredecétyltriméthylammonium(Cetavlon®)

$$CH_3{-}(CH_2)_{15}{-}N^+(CH_3)_2{-}CH_3,\ Br^-$$

Bromuredediméthycétylcyclohexylammonium (Biocidan®)

$$C_{16}H_{33}{-}N^+(CH_3)_2{-}C_6H_{10}(OH),\ Br^-$$

Le **chlorure de benzalkonium** est un mélange de composés dont la formule est :

$$C_nH_{2n+1}{-}N^+(CH_3)_2{-}CH_2{-}C_6H_5,\ Cl^-$$

où n est compris entre 8 et 18. Parmi les composés constituant le chlorure de benzalkonium deux dominent :

$R_1 = C_{12}H_{25}$ (n = 12 lauryl),
$R_1 = C_{14}H_{29}$ (n = 14 myristyl)

Chlorure de cétylpyridimium

$$CH_3\,(CH_2)_{15}{-}N^+C_5H_5,\ Cl^-$$

Figure V.9 – Les ammoniums quaternaires.

Les plus efficaces sont les sels d'ammonium quaternaire. En plus du pouvoir mouillant et émulsifiant que leur confèrent leurs groupements cationiques lipophiles, ils sont fortement bactériostatiques à des concentrations minimes (de 1 pour 10 000 à 1 pour 100 000). Par adsorption au niveau des surfaces cellulaires, ils entraînent une dégradation au niveau de la membrane cytoplasmique ou une inactivation des enzymes respiratoires et de la glycolyse. Leur spectre d'activité est variable, assez élevé sur les bactéries et champignons, réduit sur les virus et les spores.

Il faut être attentif au fait que des micro-organismes, comme les *Pseudomonas*, trouvent au sein même de certains ammoniums quaternaires un substrat leur permettant de se multiplier, le désinfectant devenant source d'azote et de carbone.

Si les ammoniums quaternaires sont un des bienfaits de notre civilisation, ils en sont aussi un des écueils, car les usines qui les synthétisent et les eaux usées qui les recueillent en déversent des quantités importantes dans les rivières. Leur présence est quelquefois révélée de façon spectaculaire par une accumulation massive de mousse. Non biodégradables, ils compromettent gravement l'équilibre écologique du milieu récepteur et empêchent l'épuration. Heureusement, la synthèse de nouveaux détergents biodégradables, seuls autorisés par la loi et qu'il est donc souhaitable de voir se répandre, représente un progrès important dans la lutte contre la pollution.

3.2.9. Colorants

La plupart des colorants sont utilisés comme antiseptiques à usage local, quelques-uns seulement par voie digestive. Ils font partie de séries chimiques très diverses et leur degré d'activité est variable. Dans la série des thiazines, signalons le bleu de méthylène. Parmi les dérivés du triphénylméthane, citons le vert malachite et le vert brillant, utilisés dans le traitement des plaies superficielles, le violet de méthyle, antiseptique urinaire, le violet de gentiane, désinfectant à usage externe. Dans la série de l'acridine, les composés les plus connus sont la trypaflavine et la gonacrine. Ce sont des désinfectants buccaux employés également en lavages urétraux et vésicaux.

Ils ont fréquemment une action **sélective** vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou négatif. Ainsi, le cristal violet inhibe la croissance de la plupart des bactéries à Gram positif, sélectionnant en même temps les bactéries à Gram négatif. Il en est de même du vert brillant et du vert malachite. Les dérivés de l'acridine sont aussi plus actifs sur les bactéries à Gram positif. Cette propriété les rend utiles pour la culture sélective des micro-organismes.

3.2.10. Conservateurs alimentaires

Le choix d'un additif antimicrobien est souvent difficile. Un bon conservateur doit répondre à certains critères : il doit être plutôt bactéricide que bactériostatique et agir également sur les levures et les champignons ; il doit être actif aussi bien sur les germes pathogènes que sur ceux qui produisent des altérations ; il doit être stable et non détruit au contact de l'aliment ou du micro-organisme ; il ne doit pas favoriser l'apparition de résistances et, surtout, il doit être inoffensif et ne pas diminuer la valeur nutritive de l'aliment.

Les conservateurs alimentaires sont utilisés empiriquement depuis la plus haute Antiquité : emploi du sel (salaisons), du

Copyrighted material

sucre (confitures), de l'acide lactique (yaourt, choucroute), de l'acide acétique (fruits, légumes tels que cornichons, oignons et autres *pickles*, ainsi que diverses sauces mayonnaise, ketchup, fumage des poissons et des viandes).

Le chlorure de sodium est un agent antimicrobien efficace, en premier lieu par son effet dépresseur sur l'activité de l'eau (Aw) des produits, en second lieu par l'effet spécifique des ions Cl qu'il libère dans l'eau.

Les nitrates sont réduits en nitrites (forme active de ces composés) dans les produits alimentaires, sous l'action notamment des microcoques. Ces additifs sont utilisés traditionnellement dans la salaison de la charcuterie où leurs fonctions sont multiples :

– ils contribuent à l'apparition de la couleur et de la flaveur caractéristiques des produits de charcuterie ;

– au cours de la cuisson, ils donnent naissance à des inhibiteurs efficaces de la croissance de *Cl. botulinum* et à sa redoutable neurotoxine.

L'anhydride sulfureux est utilisé depuis plusieurs siècles pour la conservation des vins. Les solutions aqueuses d'acide sulfureux ou de bisulfite de sodium sont d'excellents agents de conservation des denrées alimentaires (jus de fruits) au cours de leur préparation. Elles ont un effet très marqué, en particulier sur les levures. De nombreux autres agents sont utilisés. Les principaux sont les acides organiques : acide benzoïque, acide salicylique, acide sorbique ou leurs esters (l'acide propionique et ses sels, particulièrement actifs contre les moisissures, sont des additifs qui permettent d'allonger la durée de vie du pain et d'autres produits céréaliers ; ils sont sans effet notable sur les bactéries et sur les levures) ; les composés phénolés : phénols, o-crésols, thymol, gaïacol, eugénol ; les quinones : para-benzoquinone, 1-4 naphtoquinone ; enfin, certains composés furaniques (ajoutés de façon empirique dans les aromates et épices diverses).

Les antibiotiques, malgré leur efficacité antimicrobienne, n'ont actuellement pas beaucoup d'applications dans l'industrie alimentaire pour diverses raisons, dont les plus importantes semblent être essentiellement le risque d'effets indésirables chez le consommateur et la possibilité de sélection de souches résistantes aux antibiotiques (voir § 4.3.4).

3.2.11. Stérilisation par les gaz

La stérilisation par les gaz est un procédé élégant et pratique qui tend à s'imposer chaque jour davantage. On a recours aux gaz soit pour stériliser des produits instables à la chaleur, soit pour la désinfection des locaux (chambres des malades), soit encore pour la stérilisation d'objets en plastique (boîtes de Pétri, tubes à essai, etc.). Pour la désinfection des surfaces et des locaux, le gaz utilisé doit diffuser très facilement dans l'air. On doit pouvoir le préparer facilement. Il doit être efficace vis-à-vis de tous les micro-organismes. On doit tenir compte de la toxicité des produits utilisés ainsi que de leur risque d'inflammabilité.

3.2.11.1. Formaldéhyde

Les vapeurs de formaldéhyde ont un pouvoir bactéricide puissant qui augmente avec la température et l'humidité. À 22 °C et en présence d'un taux d'humidité de 60 à 80 %, le temps requis pour la stérilisation sera de quelques heures. On réserve ce mode de stérilisation aux divers objets susceptibles d'être altérés à la chaleur : le caoutchouc, les matières plastiques et les produits chimiques en poudre. Malgré les risques, les vapeurs ou **fumigations** de formol sont d'un usage courant pour la désinfection des locaux.

Le formaldéhyde réagit avec les acides aminés et les protéines. La fixation du formaldéhyde au niveau de la bactérie est fonction du degré d'hydratation de celle-ci. Dans le cas de la décontamination par voie aérienne, la réaction avec l'ammoniac transforme le formol en hexaméthylènetétramine et permet de le neutraliser très rapidement dans le local après traitement. L'aldéhyde formique est un produit irritant et un puissant allergène responsable de sensibilisations cutanées (eczéma, urticaire) et respiratoires (rhinite, asthme).

3.2.11.2. Oxyde d'éthylène

C'est un corps gazeux à la température ordinaire, liquide en dessous de 10 °C, à pouvoir inflammable élevé. En revanche, son mélange avec de l'anhydride carbonique ou du fréon le rend ininflammable sans diminuer son pouvoir bactéricide. Son spectre d'activité est large et son pouvoir sporicide prononcé ; son action à basse température lui permet d'entrer en contact avec les produits et objets les plus divers ; grâce à son pouvoir pénétrant, il assure la stérilisation des tissus et même de certains plastiques.

Les stérilisateurs à oxyde d'éthylène fonctionnent à 60 °C. L'oxyde d'éthylène agit en bloquant le processus de reproduction des micro-organismes par voie chimique. Le matériel à stériliser doit être conditionné dans des emballages souples qui laissent diffuser le gaz.

3.2.11.3. β-propionolactone

Ce composé liquide à la température ordinaire émet des vapeurs qui sont activement bactéricides, sporicides, virucides et fongicides. Il est nettement plus actif que les antiseptiques précédents : 25 fois

Copyrighted material

plus que le formol et 4 000 fois plus que l'oxyde d'éthylène. Il n'est ni inflammable ni explosif. Son action est pénétrante, son élimination rapide. En solution aqueuse, il subit une hydrolyse. On peut l'utiliser aussi bien pour la stérilisation d'objets, de matériel chirurgical, de catguts, de compresses, etc., que pour la désinfection des locaux et même la stérilisation des milieux de culture.

3.2.11.4. Ozone

Très efficace, l'ozone est utilisé pour la stérilisation de l'eau ; il a, de plus, l'avantage de détruire les substances qui colorent l'eau ou qui sont génératrices de mauvais goût. Pourtant, son action microbicide n'est pas rémanente.

3.2.12. Essences volatiles (huiles essentielles)

Les essences naturelles ont un pouvoir bactériostatique limité qu'elles doivent à leurs composés phénoliques et terpéniques et aussi, dans une plus faible mesure, à leurs alcools et aldéhydes. Les plus utilisées sont l'essence d'eucalyptus comme antiseptique des voies respiratoires, l'essence de girofle comme désinfectant et cautérisant en chirurgie dentaire, l'essence de niaouli pour le traitement des plaies, des brûlures et comme antiseptique respiratoire, l'essence de thym comme antiseptique intestinal et respiratoire, l'essence de santal dans la désinfection des voies urinaires. Toutes ces essences sont de plus en plus remplacées par leurs principes actifs : l'eucalyptol pour l'essence d'eucalyptus, l'eugénol extrait de l'essence de girofle, le goménol de l'essence de niaouli et le thymol de l'essence de thym. Ces huiles essentielles sont aussi utilisées comme conservateurs alimentaires.

3.3. Choix des molécules désinfectantes

Pour assurer une bonne désinfection, dans l'industrie alimentaire en particulier, le produit retenu devrait répondre aux exigences suivantes :

– avoir un spectre d'activité très large ;
– avoir une action rapide et durable ;
– avoir une efficacité égale en présence de résidus de souillure ;
– être utilisé à faible concentration ;
– être peu coûteux ;
– pouvoir être utilisé dans des conditions très différentes de pH et de dureté ;
– être sans action corrosive sur les supports ;
– ne laisser aucun résidu après rinçage ;
– être sans danger, même à forte concentration, pour le métabolisme de l'homme.

Aucun produit ne réunit toutes ces propriétés. Le choix d'une substance désinfectante parmi celles qui ont été décrites se fera en fonction d'un certain nombre de critères : réglementaires, d'activité, de prix de mise en œuvre, etc.

Les associations sont possibles mais certaines règles de contre-indication sont bien connues (organomercuriels avec dérivés iodés, ammoniums quaternaires avec surfactants anioniques par exemple).

Les surfactants anioniques et non ioniques permettent de solubiliser les antiseptiques ou les désinfectants insolubles et facilitent donc leur pénétration à travers la membrane bactérienne. Cependant, beaucoup d'interférences existent, par exemple lorsque l'agent mouillant neutralise les charges électriques du principe actif ou qu'il influence le pH optimum d'activité.

L'éthanol à faible concentration (de 10 à 20 %) renforce l'action des certaines substances (hexamidine, chlorhexidine…) ; de plus, il a un effet protecteur contre la contamination des solutions de réserve.

3.4. Mesure de l'activité bactéricide

L'activité antimicrobienne d'un produit peut être évaluée selon trois stades :

– les tests du premier stade déterminent l'activité au laboratoire *in vitro* ;
– les tests du deuxième stade évaluent l'activité du produit lorsqu'on se rapproche des conditions pratiques d'utilisation ;
– les tests du troisième stade sont des essais réalisés sur le site *(in situ)*. Ils reflètent l'efficacité du produit dans les conditions réelles d'utilisation.

Pour mettre en évidence cette activité, des méthodes spécifiques ont été mises au point dont les principes s'écartent sensiblement de ceux utilisés pour les antibiotiques. Toutes sont tributaires de facteurs inhérents au produit ou à sa forme commerciale, qui seront rapidement analysés. Le solvant habituel est l'eau, mais d'autres solvants (éthanol, propylène glycol, etc.) sont bactéricides et il est nécessaire de connaître leur activité syner-

Copyrighted material

gique ou antagoniste. Le rôle du pH est fondamental, surtout pour les acides faibles.

L'action bactéricide d'un antiseptique est très sensible au changement de **température**, surtout s'il possède une énergie d'activation élevée. Les **surfactants**, qui sont fréquents dans les préparations, doivent favoriser le contact de l'antiseptique avec les micro-organismes mais, ajoutés à une concentration importante, ils peuvent diminuer son activité bactéricide. La concentration des **électrolytes** doit être aussi minime que possible afin d'éviter l'inactivation de certains antiseptiques par **chélation**, complexation ou insolubilisation.

3.4.1. Principales méthodes

3.4.1.1. Méthode de suspension de germes

La technique de suspension de germes est la plus employée. Son principe est de préparer une suspension titrée de bactéries, puis d'ajouter le produit à tester à une certaine concentration. Après un temps de contact déterminé, on évalue le nombre de survivants. Le point le plus délicat de la méthode est la numération de ces bactéries survivantes qui doivent être immédiatement transférées sur un milieu de culture favorable à leur développement.

3.4.1.2. Méthode par empreinte sur gélose

Le milieu de culture gélosé est directement appliqué sur la surface à analyser. La gélose nutritive doit contenir un neutralisant des désinfectants et des détergents utilisés. Cette méthode, au demeurant simple et relativement peu coûteuse, présente des inconvénients de plusieurs ordres :

– la faible surface échantillonnée, alors que la biocontamination peut être très hétérogène ;

– l'impossibilité de pratiquer un prélèvement fiable sur des surfaces humides ;

– l'impossibilité d'évaluer plus de 200 colonies par boîte.

Une variante utilise du ruban adhésif dont on applique une surface mesurée sur le matériau à examiner. On le fait adhérer par pression de la main puis, l'ayant détaché, on le dépose sur un milieu de culture gélosé et sec durant quelques dizaines de secondes. Après incubation à la température optimale de culture des bactéries recherchées, on dénombre les colonies. Cette méthode donne d'excellents résultats pour rechercher les *Salmonella*, les *Staphylococcus* pathogènes, les *Streptococcus* D et les *Enterobacteriaceae* à l'aide de milieux sélectifs.

Des techniques plus récentes comme le Pétrifilm® permettent une récupération directe des germes sur un substrat de culture.

3.4.1.3. Méthode dite des porte-germes

Les bactéries sont fixées sur des substances inertes dites porte-germes puis mises en contact avec le désinfectant à étudier ou ses dilutions durant un temps donné. On recherche par culture si les micro-organismes ont résisté ou survécu à l'agent antimicrobien. Ces porte-germes sont des bandelettes de papier-filtre de qualité standard que l'on immerge dans une culture de 24 heures en bouillon d'une bactérie test. Ils sont utilisés tels quels à l'état humide ou après dessiccation durant 24 heures à 37 °C.

3.4.1.4. Méthode de dilution-neutralisation

La méthode de dilution-neutralisation consiste, après avoir testé au préalable l'efficacité du neutralisant, à mettre en contact pendant 5 minutes à 21 °C les souches bactériennes avec différentes concentrations du produit soumis à l'analyse, puis à neutraliser l'antiseptique. La numération des survivants pour l'étude du pouvoir bactéricide se fait à partir d'un échantillon de chaque dilution sur un milieu gélosé contenant le neutralisant.

3.4.1.5. Méthode de filtration sur membrane

Voisine de la précédente, cette méthode est fondée sur la filtration des différentes concentrations d'antiseptiques ou de désinfectants mis en présence de l'*inoculum* bactérien. Ces membranes, lavées plusieurs fois, sont ensuite déposées sur un milieu de culture contenant le neutralisant.

La méthode de filtration sur membrane est en général choisie en l'absence de neutralisants efficaces, plusieurs lavages pouvant suffire à éliminer l'antiseptique. Elle permet d'apprécier la vitalité de toutes les bactéries mises en contact avec l'antiseptique mais ne convient pas pour les antiseptiques non filtrables.

3.4.1.6. Méthode de l'écouvillonnage

Pour l'examen des surfaces irrégulières, on a recours à des écouvillons de coton hydrophile ou d'alginate de sodium. On mouille préalablement les zones à explorer. Dans ces conditions, on arrive à récupérer 50 % des micro-organismes.

3.4.1.7. Épreuve de rinçage

L'épreuve de rinçage permet de rechercher d'une façon pratique l'action des ammoniums quaternaires sur des surfaces contaminées. Elle consiste à utiliser de petits gobelets que l'on remplit, en premier lieu, avec du lait écrémé stérilisé auquel on ajoute un mélange de *St. aureus* et d'*E. coli*. Après 15 minutes de contact, le gobelet est vidé, rempli avec la solution d'ammonium quaternaire, puis vidé de nouveau. On dénombre les bactéries présentes sur les parois internes après écouvillonnage et culture. Le même essai est réalisé sur un gobelet témoin sans antiseptique.

3.4.2. Stades de mesures

3.4.2.1. Tests du premier stade

Les normes NF fixent un certain nombre de paramètres :

– les souches de référence à utiliser Par exemple, pour la mesure de l'activité antibactérienne, les souches bactériennes

Copyrighted material

utilisées sont *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *St. aureus*, *Str. faecalis* et *M. smegmatis* ;
- la quantité d'*inoculum* ;
- les temps de contact entre les souches et le produit testé (5 minutes) ;
- les températures d'essai (20 °C pour les désinfectants, 32 °C pour les antiseptiques) ;
- la liste non exhaustive des substances interférentes.

La mesure de l'activité se fait par la technique de suspension de germes, la méthode de dilution-neutralisation ou la méthode de filtration sur membrane.

3.4.2.2. Tests du deuxième stade

Ce sont des méthodes cherchant à déterminer la concentration usuelle d'un désinfectant (ou d'un procédé de désinfection) en se rapprochant des conditions pratiques d'utilisation.

Elles déterminent, dans des conditions strictement standardisées, les concentrations minimales pour lesquelles le produit est capable de réduire de 99,999 % en 5 minutes de contact, à 20 °C en présence de substances interférentes de référence (protéines, eau dure, etc.), des souches de micro-organismes définis.

La numération des micro-organismes est effectuée sur des supports lisses de référence (verre, acier, matière plastique) par la méthode des porte-germes.

3.4.2.3. Tests du troisième stade

Ce sont des méthodes non normalisées, permettant de juger sur le terrain de l'efficacité d'un produit, d'un procédé, dans des conditions réelles d'emploi. On distingue trois types de méthodes :
- par écouvillonnage ;
- par empreinte sur gélose ;
- par lavage, rinçage, récupération ou brossage, lavage, récupération.

4. Agents chimiothérapeutiques

4.1. Historique

La **chimiothérapie**, c'est-à-dire l'utilisation d'agents chimiques en thérapeutique, prit son véritable essor en 1909 lorsque Ehrlich formula le principe de base suivant : pour être utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses, une substance doit être nuisible pour le micro-organisme parasite mais inoffensive pour les cellules hôtes. Elle doit être douée de **toxicité sélective**. Les antibiotiques et les sulfamides ont cette qualité. Les antiseptiques, en dépit de leur haute activité, ne peuvent être administrés par voie générale car ils sont toxiques.

L'étude systématique des composés organiques de synthèse conduisit Ehrlich à la découverte des arsphénamines, dérivés arsenicaux actifs dans le traitement de la syphilis ; leur chef de file était le Salvarsan®. C'était la première grande victoire de la chimiothérapie.

Une deuxième étape fut franchie en 1935 lorsque Domagk, en Allemagne, démontra qu'un colorant diazoïque, la parasulfamidochrysoïdine (Prontosil®), était capable de guérir les infections streptococciques expérimentales de la souris. Les travaux de l'Institut Pasteur démontrèrent que la partie active est le sulfamide ; en quelques années, plus de 5 000 sulfamides différents furent synthétisés.

La troisième étape fut celle des antibiotiques. La connaissance du pouvoir bactériostatique de certains micro-organismes vis-à-vis d'autres micro-organismes avait déjà été signalée par Pasteur et Joubert à propos du bacille charbonneux et de sa disparition dans les urines. Cependant, l'ère véritable des antibiotiques commença en 1929 lorsque Flemming fit cette observation apparemment anodine : sur une boîte de Pétri ensemencée avec des *Staphylococcus*, la présence de quelques colonies d'une moisissure du genre *Penicillium*, un contaminant, provoque une inhibition de la croissance des bactéries mises en culture. Il en déduisit que ce champignon sécrétait une substance bactériostatique susceptible d'être utilisée en thérapeutique. Il cultiva en masse le *Penicillium* et montra que ses extraits étaient bactéricides sans être toxiques pour les cellules animales. Il proposa d'appeler **pénicilline** le principe actif de ces filtrats.

La découverte de Flemming serait probablement tombée dans l'oubli si, en 1939, deux chercheurs britanniques, Florey et Chain, n'avaient entrepris d'extraire et de purifier la pénicilline à grande échelle en vue d'essais thérapeutiques. Les

Copyrighted material

résultats furent spectaculaires. On parla de drogue miracle. La Seconde Guerre mondiale stimula les méthodes de développement du champignon et de production industrielle de son principe actif et confirma la haute valeur thérapeutique de la pénicilline. Aux États-Unis, d'énormes moyens financiers furent alors mis à la disposition de programmes systématiques de recherche destinés à l'isolement d'autres antibiotiques.

À partir de 1939, des milliers d'antibiotiques furent isolés, sélectionnés, soumis aux essais thérapeutiques. Ce fut l'âge d'or des antibiotiques qui dura jusqu'en 1959.

C'est pendant cette période que les principaux antibiotiques encore utilisés de nos jours furent découverts : la pénicilline, la céphalosporine C en 1953 par Newton et Abraham, à partir d'une culture de *Cephalosporium acremonium*, la streptomycine, premier aminoside isolé par Waksman en 1944 à partir d'une culture de *Stm. griseus*, les tétracyclines, le chloramphénicol, etc. Ce fut une véritable révolution en thérapeutique puisque, l'une après l'autre, les maladies infectieuses les plus dangereuses étaient maîtrisées, vaincues par les antibiotiques. Depuis 1965, une nouvelle période semble prolonger cette époque glorieuse. Elle est caractérisée par les antibiotiques semi-synthétiques, en particulier les β-lactamines.



Figure V.10 – Boîte de culture de *Staphylococcus aureus* contaminé par *Penicillium* (expérience historique de Fleming) avec zone d'inhibition.

4.2. Classification

La distinction classique entre antibiotiques (élaborés par des micro-organismes) et sulfamides (produits de synthèse) n'a plus qu'un intérêt historique, de nombreux antibiotiques faisant actuellement l'objet d'une synthèse. Les antibiotiques, dont il sera question, engloberont donc ces deux catégories d'agents chimiothérapeutiques. Le nombre et l'importance des antibiotiques sont tels que de nombreuses tentatives de classification ont été proposées. Parmi les 4 000 antibiotiques actuellement décrits (tous ne sont pas commercialisés), environ 70 % sont synthétisés par les micro-organismes *(fig. V.10)*.

Certaines classifications se sont fondées sur le **spectre d'activité** : antibiotiques à large spectre ou à spectre étroit, antibiotiques antimycosiques, antitumoraux, antiviraux, antiprotozoaires, etc. Il est également possible de les classer suivant leur origine. On se heurte malheureusement à un inconvénient majeur car près de 60 % des antibiotiques sont élaborés par les actinomycètes, un groupe gigantesque de bactéries assez mal connu et mal défini. Les essais de taxonomie numérique ont révélé qu'il n'y avait aucune corrélation entre les phénons, ou les groupements de souches, et la production d'antibiotiques.

En général, c'est la **classification chimique** qui est le plus souvent en usage. Elle part du principe que les antibiotiques sont composés d'unités chimiquement définies dont le nombre est toujours faible. Le *tableau V.7* reproduit ainsi les principales familles d'antibiotiques actuellement connus.

On peut enfin grouper les antibiotiques en fonction de leur **site d'action** (paroi, membrane, acides nucléiques, protéines, etc.). Pour des raisons de simplicité, nous adopterons cette dernière classification.

4.3. Mode d'action des antibiotiques

Pour employer un antibiotique en pathologie humaine, il est nécessaire au préalable de tester son activité *in vitro* sur une liste exhaustive d'espèces microbiennes. Il faut aussi connaître ses

Copyrighted material

Tableau V.7 – Les antibiotiques groupés par famille : leur origine, leur spectre d'activité.

Famille	Antibiotique	Origine	Découverte	Spectre d'activité Cocci Gram +	Cocci Gram −	Bacilles Gram +	Bacilles Gram −
β-lactamines							
Pénicillines							
G	Pénicilline G	*Penicillium notatum* et *chrysogenum*	1929	+	+	+	−
M	Méthicilline	Synthèse		+	+	+	−
	Oxacilline						
A	Ampicilline	Synthèse		+	+	+	+
Pénicillines antipyocyaniques	Carbénicilline	Synthèse		+	+	+	+
	Mezlocilline	Synthèse					
	Azlocilline	Synthèse					
	Pipéracilline	Synthèse					
Céphalosporines	Céphalosporine C	*Cephalosporium acremonium*	1945	+	+	+	+
1[re] génération	Céfalotine	Synthèse	1962				
	Céfalorodine	Synthèse					
2[e] génération	Céfamandole	Synthèse	1971				
	Céfuroxine	Synthèse					
3[e] génération	Céfotaxime	Synthèse					
4[e] génération	Cefsulodine	Synthèse					
Céphamycines	Céphamycine C	*Streptomyces lactamadurans*		+	+	+	+
	Céfoxitine	*Synthèse*					
	Céfoxitine	Synthèse					
Oxa-1 céphamycine	Lamoxactam	Synthèse	1980	+	+	+	+
Oligosaccharides	Streptomycine	*Streptomyces griseus*	1944				
	Néomycine	*Streptomyces fradiae*	1949				
	Framycétine	*Streptomyces lavendulae*	1947				
	Paromomycine	*Streptomyces rhimosus*	1959				
	Kanamycine	*Streptomyces kanamyceticus*	1958	+	+	+	+
	Gentamicine	*Micromonospora monospores*					
	Tobramycine	*Streptomyces tenebrarius*	1967				
	Sisomicine	*Micromonospora inyoensis*					
	Dibékacine	(Synthèse)					
	Amikacine						
	Nétilmicine						
Tétracyclines	Tétracycline	*Streptomyces texasi*	1953				
	Chlortétracycline	*Streptomyces aureofaciens*	1946				
	Oxytétracycline	*Streptomyces rimosus*	1950				
	Déméthylchlor-tétracycline	*Streptomyces aureofaciens*		+	+	+	+
	Doxycycline						
	Minocycline						
Phénicols	Chloramphénicol	*Streptomyces venezuelae*	1947	+	+	+	+
	Thiamphénicol	(Synthèse)					
Macrolides	Erythromycine	*Streptomyces erythreus*	1952				
	Spiramycine	*Streptomyces ambofaciens*	1954				
	Oléandomycine	*Streptomyces antibioticus*	1954				
	Kitasamycine	*Streptomyces kitasatoensis*	1953	+	+	+	−
	Josamycine	*Streptomyces narbonensis*	1967				
	Lincomycine	*Streptomyces lincolnensis*					
Synergistines	Virgymicine	*Streptomyces virginiae*					
	Pristinamycine	*Streptomyces pristinae spiralis*	1962	+	+	+	−
Rifamycines	Rifamycine SV	*Streptomyces méditerranée*	1948	+	+	+	−
	Rifampicine	*Streptomyces méditerranée*		+	+	+	+
Polypeptides basiques	Polymyxines	*Bacillus polymyxa*	1947	−	−	−	+
	Bacitracine	*Bacillus licheniformis*	1945	+	+	+	−
	Thyrothricine	*Bacillus brevis*	1939				
Antibiotiques "isolés"	Fucidanine	*Fusidium coccineum*		+	−	−	−
	Novobiocine	*Streptomyces spheroïdes*	1955	+	−	−	−
	Vancomycine	*Streptomyces orientalis*		+	−	−	−
	Fosfomycine	*Streptomyces fradiae*		+	+	+	+
	Nitro-imidazols	(Synthèse)			anaérobies		

Copyrighted material

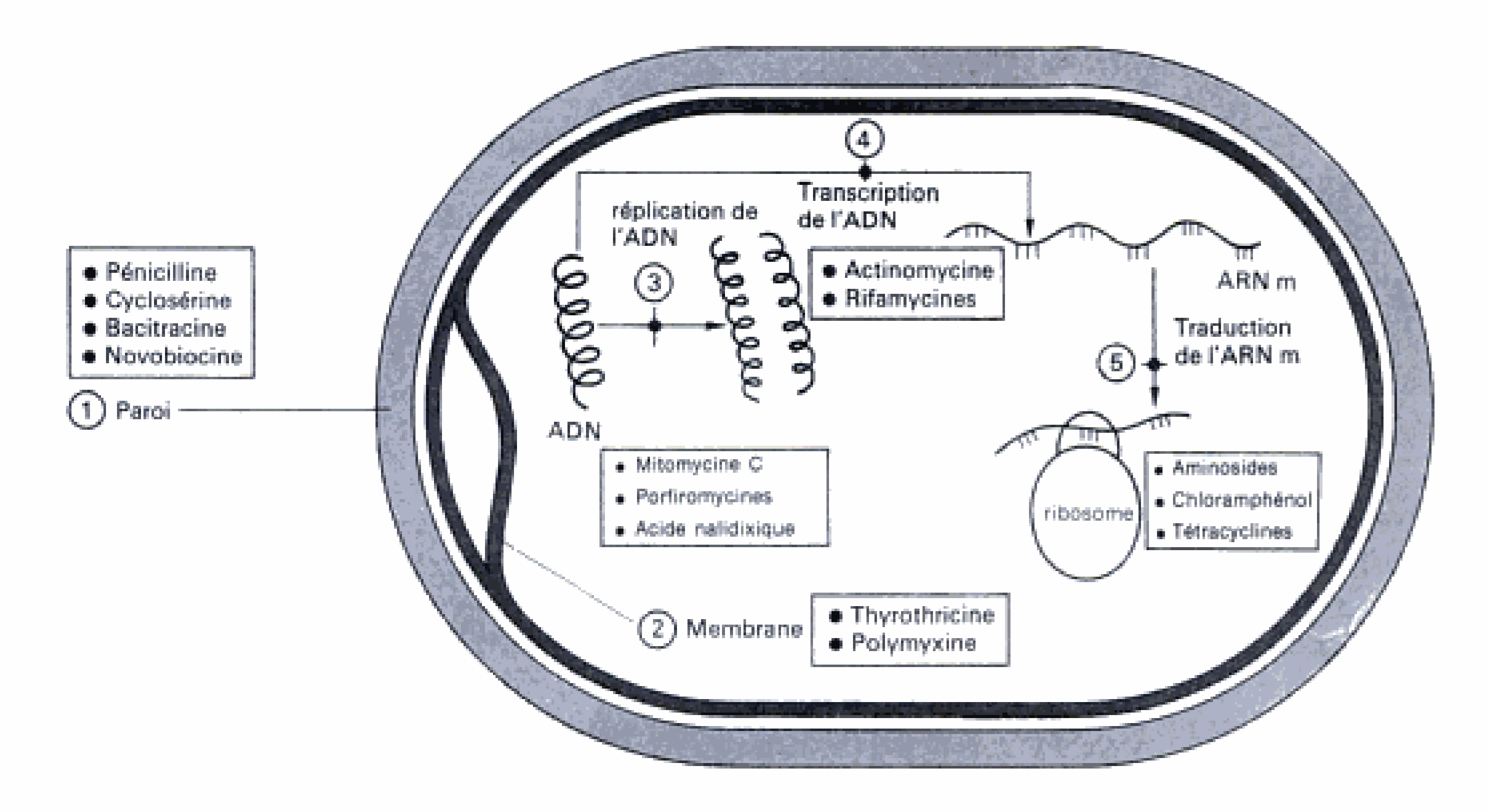


Figure V.12 – Mode d'action des antibiotiques sur les bactéries.

paroi. Associé à un noyau thiazolidine, il forme l'acide 6-amino-pénicillinique, structure de base des pénicillines. Relié à un noyau dihydrothiazine, le cycle ß-lactame donne naissance à l'acide 7-amino-céphalosporanique qui est à l'origine des céphalosporines.

Les **pénicillines** se distinguent les unes des autres par la nature du radical lié au noyau *(fig. V.13)*, par leurs propriétés physiques (solubilité…) et par leur spectre d'activité. Elles sont synthétisées par des mutants des souches de *Pe. chrysogenum* dont la production est de l'ordre de 40 g·L^{-1} de pénicilline G. Par action chimique ou enzymatique, on obtient les diverses pénicillines. Ce sont les moins toxiques de tous les antibiotiques. Seuls les accidents allergiques sont notables. Toutes les pénicillines ou leurs produits de dégradation peuvent, en effet, se comporter comme des haptènes et former avec les protéines cutanées ou sériques des antigènes complets responsables de phénomènes de sensibilisation. L'accident le plus grave est le choc anaphylactique, rapidement mortel par collapsus cardio-vasculaire.

Formule chimique

Acide 6-amino-pénicillanique
Pénicilline G
Méthicilline
Ampicilline
Carbénicilline

Figure V.13 – Famille des pénicillines.

Copyrighted material

Il existe quatre générations de **céphalosporines** semi-synthétiques *(fig. V.14)* :

– dans la première génération (apparue en 1962), elles sont différentes par les chaînes latérales, assez résistantes aux β-lactamases, mais sensibles aux céphalosporinases de nombreux bacilles à Gram négatif ;

– dans la deuxième génération, elles sont de propriétés voisines mais plus résistantes aux céphalosporinases ;

– dans la troisième génération, elles sont très résistantes et beaucoup plus actives (CMI très basse en particulier sur les entérobactéries) ;

– dans la quatrième génération, très récente, elles sont caractérisées par un spectre d'activité très étroit (actives sur *Ps. aeruginosa*).

Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi sont **bactéricides** et agissent seulement sur les germes en phase active de multiplication (phase exponentielle). Ainsi, lorsque des bactéries à Gram positif, comme *St. aureus,* en voie de croissance sont traitées par la pénicilline, la synthèse de leur paroi est arrêtée. Les cellules continuent de croître tandis que la paroi s'amenuise progressivement. Elles s'allongent puis finissent par éclater en l'absence de barrière osmotique. Si l'on ajoute dans le milieu de culture un composé comme le saccharose, en concentration suffisante, ces cellules oblongues prennent une forme sphérique, les sphéroplastes.

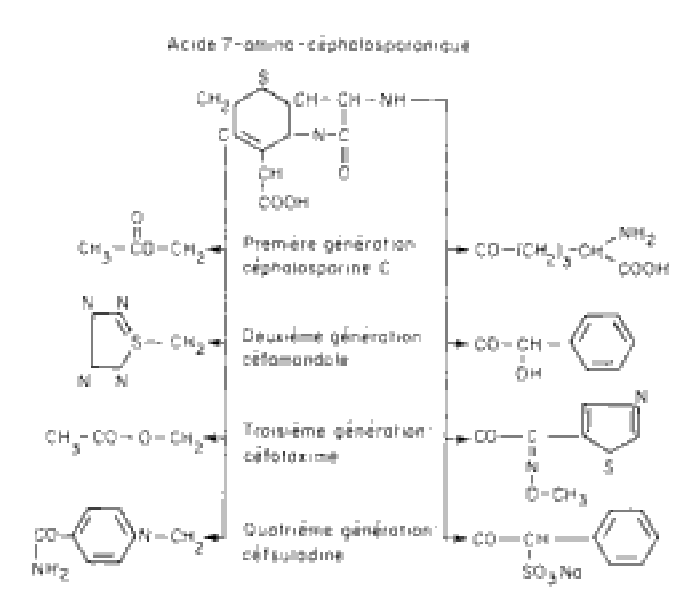


Figure V.14 – **Famille des céphalosporines.**

On constate, au cours de cette lyse ou de cette croissance sans division, une accumulation de composés précurseurs de la paroi, des nucléotides uridiniques. Pour bien comprendre le mécanisme biochimique de cette action, il convient de se reporter au schéma de la *figure II-21* qui reprend les principales étapes de la synthèse pariétale d'une bactérie à Gram positif, *St. aureus.* La cyclosérine, qui est un analogue structural de la D-alanine, coupe la chaîne de biosynthèse en inhibant de façon compétitive l'action de l'alanine racémase, qui convertit la L-alanine en D-alanine, et celle de la D-alanyl-D-alanine synthétase. La pénicilline, en raison de son analogie structurale avec un dipeptide d'alanine, empêche son incorporation dans la chaîne. Il en est ainsi avec d'autres antibiotiques comme la bacitracine, la novobiocine, etc. La fosfomycine agit à un stade plus précoce en inhibant l'action de la pyruvyl transférase, enzyme nécessaire à la synthèse de l'acide muraminique, par incorporation du phosphoénolpyruvate à l'UDP N-acétylglucosamine.

Des études plus récentes fondées sur les modifications morphologiques d'*E. coli* soumis à un traitement par les β-lactamines ont mis en évidence différents types de protéines cibles, encore appelées protéines liant la pénicilline ou PLP, leur liaison irréversible entraînant la lyse plus ou moins rapide de la cellule bactérienne. En référence à ce mécanisme d'action, on est actuellement amené à mettre au point de nouvelles molécules qui, en se fixant électivement sur une PLP déterminée, seraient douées d'une activité bactéricide maximale.

Les enzymes le plus souvent touchées sont :

– la transpeptidase et la carboxypeptidase, par inhibition de la formation de liaison entre les peptides du peptidoglycane ;

– la pyruvyl transférase, par inhibition de la formation d'UDP-N-acétylmuramyl ;

– l'alanine racémase et l'alanine synthétase, par inhibition de la formation du pentapeptide qui doit s'associer à l'UDP-N-acétylmuramyl.

4.3.2.2. Action sur la membrane cytoplasmique

Les antibiotiques de nature polypeptidique comme les polymyxines *(fig. V.15)*, la gramicidine et les antibiotiques voisins agissent sur la membrane cytoplasmique à la manière des agents tensioactifs du fait d'une charge positive. Les molécules de gramicidine forment un pore traversant une partie de la membrane plasmique, ce qui permet le passage d'ions monovalents. L'intégrité de la structure de la membrane n'est plus maintenue, en particulier l'effet de barrière osmotique. Les cellules, dont la plupart des constituants s'échappent, dégénèrent puis meurent, atteintes dans leurs fonctions vitales essentielles.

Le phénomène se reproduit indifféremment sur les cellules en voie de croissance ou non proliférantes. Il se manifeste également sur les **proto-**

Copyrighted material

Figure V.15 – **Famille des polypeptides : bacitracine.**

plastes en solution hypertonique, ce qui démontre une action spécifique au niveau de la membrane.

4.3.2.3. Action sur la synthèse des protéines

Un certain nombre d'antibiotiques agissent sur la synthèse des protéines au niveau des ribosomes en empêchant la lecture du code ou en la faussant. Parmi ceux qui inhibent la formation des protéines, certains, comme les macrolides *(fig. V.16)* (érythromycine, oléandomycine, etc.), les synergistines, la lincomycine et les tétracyclines *(fig. V.17)*, se fixent sur la fraction 50 S des ribosomes et empêcheraient la pénétration ou la fixation du complexe acide aminé-ARNt (lincomycine, tétracycline) ou le passage de ce complexe au niveau de deux sites voisins, c'est-à-dire la translocation (macrolides, fucidine). D'autres, comme le chloramphénicol *(fig. V.18)*, interviendraient plus tardivement en inhibant le processus de transpeptidation, c'est-à-dire la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés. Le chloramphénicol n'agit pas au niveau des ribosomes 80 S

Figure V.16 – **Famille des macrolides : érythromycine.**

Le nom de macrolide vient du grand cycle actonique appelé « olide » ; c'est la nature du sucre non azoté qui caractérise les antibiotiques de ce groupe.

a : Tetracycline

b : Aureomycine

Figure V.17 – **Famille des tétracyclines.**

Chloramphénicol

Thiamphénicol

Figure V.18 – **Famille du chloramphénicol.**

Copyrighted material

des cellules eucaryotes. Il entraîne aussi des perturbations dans la régulation de la synthèse des ARN (accumulation importante d'ARNm et d'ARNr). Les tétracyclines, en se combinant avec divers ions métalliques par chélation, bloquent de nombreuses réactions biochimiques (glycolyse, phosphorylation, etc.). D'autres antibiotiques tels que la streptomycine *(fig. V.19)* et les aminosides apparentés ont un mode d'action plus complexe en se comportant comme des polycations ; ils se fixent d'abord aux composés anioniques superficiels de la paroi puis pénètrent par simple diffusion à travers des pores aqueux. Les aminosides pénètrent ensuite au travers de la membrane cytoplasmique, selon un processus actif mettant en jeu la force proton-motrice du potentiel de membrane (les concentrations intracellulaires d'antibiotique sont alors de 300 à 400 fois plus élevées que celles du milieu extérieur). Ils se fixent à l'ARNr 30 S. Ils occasionnent des erreurs de lecture du code génétique et provoquent l'incorporation d'acides aminés ne correspondant pas à l'information des codons de l'ARNm. Les protéines formées dites non sens sont génétiquement létales.

Les autres aminosides se fixent également sur les ribosomes, mais les sites peuvent être multiples pour un seul antibiotique.

Avec la streptomycine, on a observé des bactéries que l'on pourrait qualifier de toxicomanes car elles ne peuvent se développer qu'en présence de cet

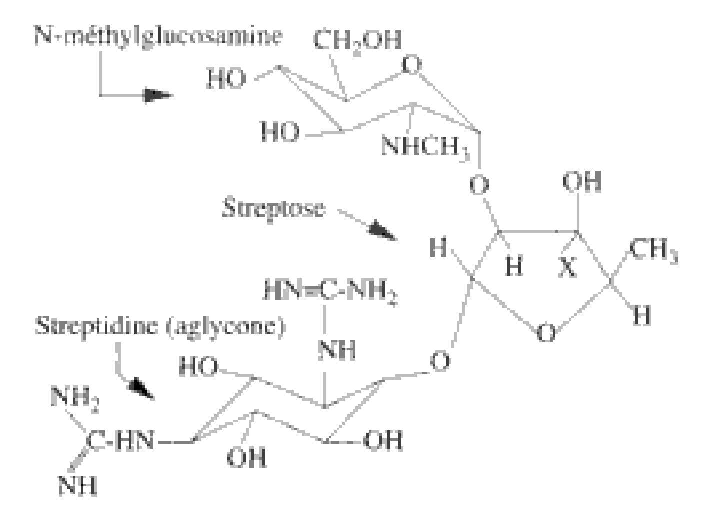


Figure V.19 – **Famille des aminosides : la streptomycine.**

Lorsque la fonction aldéhyde (X) du streptose est réduite en fonction alcool primaire, on obtient la dihydrostreptomycine.

antibiotique même si le milieu de culture contient tous les facteurs indispensables à leur croissance. Cette dépendance correspond en fait à une mutation au niveau du locus chromosomique codant pour le ribosome (partie 30 S), mutation dont les effets sont corrigés par la présence de la streptomycine.

Les *Streptococcus* sont résistants aux aminosides à basse concentration. Ce phénomène est dû à l'incapacité de ces antibiotiques à pénétrer la paroi cellulaire, ce qui les empêche d'atteindre leur cible (fractions 30 S des ribosomes) et d'exercer leur pouvoir bactéricide. Actifs également sur la membrane cellulaire, les aminosides sont doués d'une activité bactéricide. Leur spectre, considéré comme large, comprend les cocci à Gram positif *(Staphylococcus)* et à Gram négatif (gonocoque), les bacilles à Gram négatif (entérobactéries, *Brucella, Haemophilus* et parfois *Pseudomonas*) et des bacilles à Gram positif. Les mycobactéries sont sensibles à la streptomycine et à la kanamycine. Par contre, les *Streptococcus*, les pneumocoques et les bactéries anaérobies sont naturellement résistants. Ces antibiotiques, agissant seulement par inhibition de la synthèse des protéines ou des acides nucléiques, sont bactériostatiques.

4.3.2.4. Action sur les acides nucléiques

• **ADN**. La mitomycine C et les porfiromycines, en formant des ponts entre les deux chaînes de l'hélice d'ADN, empêchent leur migration au moment de la division cellulaire. La réplication de l'ADN par l'ADN polymérase, qui nécessite une séparation totale des deux chaînes, devient impossible. Ces substances inhibent donc la synthèse de l'ADN, bloquent la division et provoquent l'accumulation dans la bactérie d'une grande quantité de désoxyribonucléosides libres et de thymine. Ces composés sont doués de propriétés antitumorales. Les quinolones paraissent agir d'une façon similaire. Leur cible moléculaire exacte a été identifiée comme étant l'ADN gyrase, enzyme impliquée dans la formation de l'hélice d'ADN. L'acide nalidixique est aussi un inhibiteur d'une étape de la synthèse de l'ADN. Son effet sélectif sur les bactéries à Gram négatif est mis à profit dans les milieux de culture d'isolement.

• **ARN**. L'actinomycine représente le chef de file de ce type d'agents. Elle ne bloque pas l'acti-

Copyrighted material

vité de l'ADN polymérase, qui réplique l'ADN, mais celle de l'ARN polymérase, qui copie l'une des chaînes de l'ADN en l'utilisant comme matrice pour la synthèse de l'ARN messager. La présence d'actinomycine empêche la progression de l'ARN polymérase le long de cette matrice. La novobiocine a un mode d'action plus complexe : elle inhibe à la fois la synthèse de l'ADN (au niveau de l'ADN gyrase) puis, de façon moins nette, celle des ARN en bloquant l'ARN polymérase.

4.3.2.5. Action par inhibition compétitive

L'inhibition compétitive est le mode d'action antibactérien de certaines substances appelées **antimétabolites** (voir chap. III.) ou **analogues structuraux** parce qu'elles interfèrent avec les métabolites normaux de la cellule. On peut distinguer trois types principaux d'antimétabolites :

– les analogues de vitamines, comme les sulfamides, l'aminoptérine et beaucoup d'autres moins connus, qui sont des inhibiteurs enzymatiques (cocarboxylase, NAD^+, FMN, FAD, pyridoxal phosphate, etc.) ;

– les analogues d'acides aminés et principalement ceux qui s'incorporent dans les protéines à la place de l'acide aminé normal : parafluorophénylalanine au lieu de l'alanine, 1,2,3 triazole-3 alanine au lieu de l'histidine, etc. ;

– les analogues de bases puriques et pyrimidiques comme la 5-bromo-uracile, la 8-azaguanine et la 5-fluoro-uracile, respectivement inhibitrices de la thymine, de la guanine et de l'uracile. L'incorporation de ces antimétabolites dans les ARN ou les ADN conduit à des modifications génétiques qui seront étudiées au cours des mutations (voir chap. VI).

La plupart des antimétabolites ont une valeur antibiotique médiocre ou nulle. Seuls les sulfamides font exception à cette règle. Ce sont des analogues de structure de l'acide para-aminobenzoïque (PAB). Le PAB fait partie de la molécule d'acide folique, une vitamine qui intervient dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. En présence de sulfamides, les bactéries s'appauvrissent rapidement en acide folique et cessent de produire des bases azotées ou des acides aminés tels que la méthionine et la sérine ; c'est en effet le sulfamide qui est incorporé dans la cellule à la place du PAB et qui inhibe la synthèse de l'acide folique en bloquant la dihydrofolate synthétase. Le sulfamide arrête la croissance des bactéries sans les détruire : son action est bactériostatique ; elle s'annule en présence d'un excès de PAB. Le triméthoprime, inhibant la dihydrofolate réductase, a une action synergique avec les sulfamides. L'association de ces deux composants bactériostatiques est bactéricide.

4.3.3. Mesure de l'activité des antibiotiques

Cette recherche peut avoir plusieurs buts. Tout d'abord, pour sélectionner les antibiotiques les plus actifs, il est indispensable de mesurer cette activité. Ensuite, au cours du traitement des maladies infectieuses, il est capital de connaître l'antibiotique le plus efficace, de déterminer les concentrations humorales atteintes après administration de l'antibiotique pour définir le **taux thérapeutique**, c'est-à-dire la concentration nécessaire et suffisante pour éliminer un agent infectieux d'un organisme malade.

Pour bien comprendre cette étude, nous allons réaliser une expérience *(fig. V.20)* : dans une série

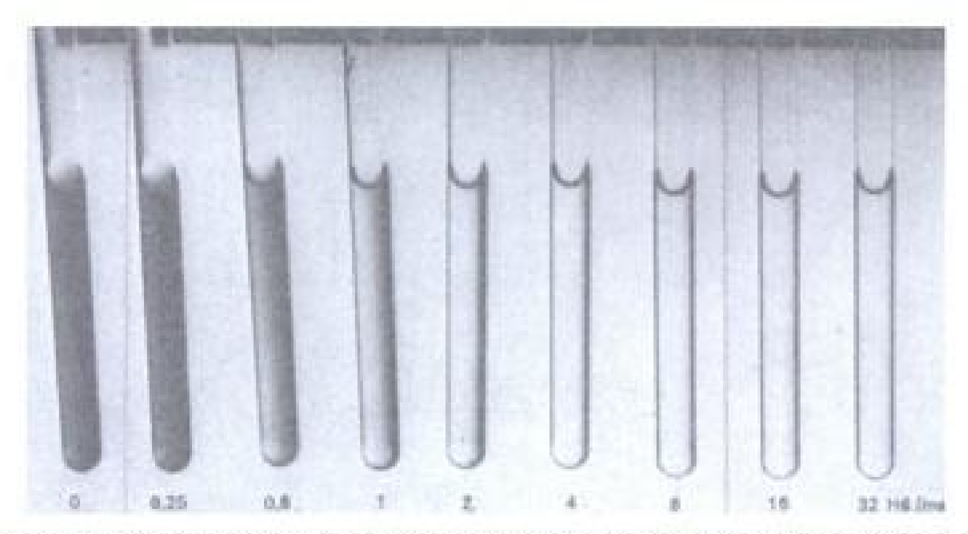


Figure V.20 – Étude de la croissance bactérienne en présence de concentrations croissantes d'antibiotique.

Copyrighted material

met une croissance de 50 % de celle du témoin, représente une valeur plus exacte. En pratique, cependant, on recherche simplement la CMI (car sa lecture peut se faire à l'œil nu selon la technique employée). Si l'antibiotique disparaît de la culture, les bactéries en phase de bactériostase reprennent rapidement leur croissance. Avec certains antibiotiques, la croissance peut ne reprendre qu'après 1 à plusieurs heures : il y a un effet postantibiotique (EPA). Le *tableau V.8* donne les valeurs de CMI de souches normales.

Dans la zone de bactéricidie, le nombre de survivants diminue plus ou moins fortement selon la nature de l'antibiotique testé. La **concentration minimale bactéricide**, ou **CMB**, est la plus petite concentration aboutissant à une destruction notable de l'*inoculum* bactérien (par définition, 0,01 % de survivants). Elle peut être comparée avec intérêt à la CMI afin de mieux connaître l'effet antibactérien de cet antibiotique. Ces deux valeurs, CMI et CMB, sont proches pour les antibiotiques dits bactéricides et éloignées pour les antibiotiques bactériostatiques.

4.3.3.1. *Principes généraux*

Toutes les méthodes ont pour objet de définir *in vitro* l'antibiotique le plus actif sur un germe, donc celui qui a le plus de chances de guérir le malade infecté par ce germe. Elles doivent tenir compte d'un certain nombre de facteurs susceptibles de modifier l'activité antimicrobienne, qui sont propres à l'antibiotique, à ses propriétés, au milieu et à la bactérie.

- **L'antibiotique**. Il doit être **stable** et conserver son activité au cours du test. À la température de 37 °C, habituellement la plus favorable à la croissance microbienne, certains antibiotiques la perdent : ainsi, en 24 heures à pH 7,0, la chlortétracycline est détruite à 80 %. Le pouvoir de diffusion de l'antibiotique joue aussi un rôle capital au cours de la mesure en milieu solide (la polymyxine diffuse mal en milieu gélosé).
- **Le milieu**. Il doit avoir une **composition** rigoureusement **définie** permettant une reproduction fidèle des résultats. Les milieux contenant du sang ou du sérum stimulent assez fortement la croissance bactérienne. Sauf nécessité, ils ne sont pas les plus indiqués, car ils peuvent inhiber l'activité antibiotique. Le glucose augmente celle de la pénicilline et diminue celle de la streptomycine. Le pH est sans doute un des facteurs les plus influents *(fig. V.22)*. Le pouvoir optimal de chaque antibiotique est conditionné par un pH optimal : la pénicilline est la plus active en milieu acide, à pH 6,6 ; la streptomycine l'est davantage en milieu alcalin puisqu'elle est 100 fois plus active à pH 7,4 qu'à pH 6,0. Au cours des mesures, on choisit le pH neutre (en fait le plus proche possible de l'organisme où le résultat sera appliqué).
- **La bactérie**. Le **nombre** de bactéries mises au contact de l'antibiotique devrait toujours être le même. En milieu solide, les zones d'inhibition observées autour des sources d'antibiotique sont inversement proportionnelles à l'abondance de

Tableau V.8 – Valeurs des C.M.I. (en µg·mL^{-1}) de souches normales *(d'après Chabbert).*

Antibiotique	*St. aureus*	*Str. A*	*H. influenzae*	*Listeria*	*Salmonella*	*Ps. aeruginosa*
Pénicilline G	0,01-0,06	0,0005-0,002	0,25-2	0,25-1	> 128	> 128
Ampicilline	0,03-0,12	0,01-0,4	0,25-2	0,25-1	1-16	> 128
Céfalotine	0,1-0,5	0,1-0,2	0,5-4	2-8	1-4	> 128
Céfuroxime	1-4	0,016-0,032	1		2-4	> 128
Céfotaxime	2-4	0,01-0,5	0,01-0,03		0,01-0,2	8-32
Streptomycine	1-4	12-50	1-4	1-16	2-16	8-32
Kanamycine	0,5-2	12-60	2-5	0,5-2	2	8-32
Chloramphénicol	3-12	1,5-6	0,5-2	2-6	1,5-3	16-32
Tétracycline	0,2-1	0,15-1,5	0,5-2	0,25-1	1-4	8
Erythromycine	0,1-0,25	0,01-0,03	1-4	0,15-0,6	> 128	> 128
Sulfadiazine	16-32	0,5-64	2-4		32-128	8-64
Polymyxine	> 128	> 128	0,2-0,5	> 128	1-2	2-8

Les valeurs supérieures à 128 µg · mL^{-1} signifient que la souche est considérée comme résistante.

Copyrighted material

des méthodes de dilution et de diffusion. Des expériences parallèles réalisées avec des souches variées (une centaine environ) et des souches de référence permettent de déterminer, pour chacune, d'une part la valeur de la CMI (méthode de dilution) et, d'autre part, le diamètre d'inhibition (méthode de diffusion). Les points obtenus sur papier semi-logarithmique (les diamètres sont portés sur les ordonnées arithmétiques et les CMI sur les abscisses logarithmiques) permettent de tracer une droite donnant, pour tout diamètre de zone d'inhibition déterminé expérimentalement, la CMI correspondante *(fig. V.23)*.

Les techniques les plus courantes sont celle de Chabbert (Institut Pasteur) et celle de Bauer et Kirby (États-Unis). Elles doivent être réalisées dans des conditions strictement standardisées afin d'être reproductibles. En plus des conditions déjà précisées (voir § 4.3.3.1.), il convient de veiller tout particulièrement aux facteurs suivants :

– la **nature du milieu de culture**. Le milieu recommandé par l'OMS est le milieu de Mueller-Hinton qui sera préparé avec soin (en particulier pour le pH) et qui sera coulé en couche de 4 mm d'épaisseur (pour obtenir une diffusion toujours identique) ;

– la **nature du disque d'antibiotique**. On se sert, dans l'immense majorité des cas, de disques de papier-filtre rigoureusement standardisés et imprégnés d'une quantité calculée d'antibiotique. Cette quantité doit être telle que, pour un germe test, le diamètre de la zone d'inhibition ne soit pas supérieur à 30 ou 35 mm. Il faudra tenir compte de plusieurs facteurs tels que la nature de l'antibiotique, sa vitesse de diffusion, son taux thérapeutique, etc. ;

– la **nature de l'*inoculum***. La souche doit être pure et jeune (culture de 18 heures) ; on utilisera une concentration de germes de l'ordre de 10^5 UFC·mL^{-1} ;

– le **temps de préincubation**. Il faut laisser à l'antibiotique le temps de diffuser dans la gélose avant de permettre aux germes de se multiplier (en routine, cette opération est le plus souvent omise).

La technique consiste à étaler uniformément sur le milieu un *inoculum* modéré de bactéries de telle sorte que, après culture, elles forment des colonies isolées (non confluantes). Aussitôt après l'ensemencement, les disques d'antibiotiques choisis sont déposés à équidistance à la surface du milieu. Après incubation durant 16 à 24 heures, un examen attentif des boîtes de Pétri révèle l'importance de l'inhibition. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition peut être convertie en CMI à l'aide de graphiques ou courbes de concordance exprimant la relation entre ces deux valeurs. On compare ensuite la CMI au taux thérapeutique.

Les concentrations en antibiotiques qu'il est possible d'obtenir dans l'organisme se définissent par une zone des taux thérapeutiques délimitée par deux valeurs critiques exprimées en µg·mL^{-1} :

– la **concentration critique inférieure**, qui correspond au taux sanguin moyen obtenu aux posologies habituelles et qui est supportable sans danger particulier pour l'organisme ;

– la **concentration critique supérieure**, qui correspond au taux sanguin maximal obtenu par l'administration de fortes doses.

Ces valeurs critiques délimitent les catégories (sensible, intermédiaire, résistant) :

– **germe sensible**. La CMI de l'antibiotique pour le germe est plus faible que la concentration critique inférieure ; la souche pourra être atteinte par un traitement par voie générale et à dose usuelle ;

– **germe de sensibilité intermédiaire**. La CMI étant à l'intérieur de la zone des taux thérapeuti-

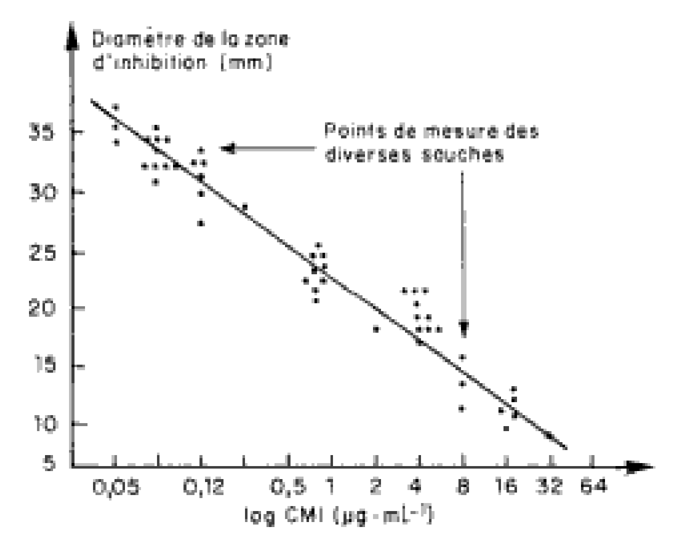


Figure V.23 – **Courbes de concordance.**

Elle établit, pour un antibiotique donné, une relation entre les CMI déterminées par la méthode de référence et les diamètres des zones d'inhibition (*d'après J.P. Gueho et D. Lecq, Techniques de l'antibiogramme, Opéron 1982 n° 2, UPBM*).

Copyrighted material

ques (entre la concentration critique inférieure et la concentration critique supérieure), la souche sera atteinte soit par une posologie élevée par voie générale, soit par un traitement local, soit dans un compartiment (sang, liquide intracellulaire, tissu adipeux, etc.) où l'antibiotique se trouve physiologiquement concentré ;

– **germe résistant**. La CMI est plus élevée que la concentration critique supérieure, la souche ne peut pas être atteinte quels que soient la dose et le type de traitement employés ; autrement dit, une souche est résistante *in vivo* lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration qu'il est possible d'atteindre au niveau du foyer infectieux (OMS). Il faut bien distinguer cette résistance clinique (corrélative d'un échec thérapeutique par rapport au malade) de la résistance absolue à l'échelle microbienne car, *in vitro*, la croissance du germe pourra être inhibée. Cette résistance de la souche peut être naturelle ou acquise.

4.3.3.4. Antibiogrammes automatisés

Des appareils permettent une certaine automatisation et une meilleure standardisation de l'antibiogramme ; tous utilisent un milieu de croissance liquide où la densité microbienne obtenue en présence d'un antibiotique est mesurée au photomètre puis comparée à celle d'une culture témoin. Les uns, comme l'autobac (General Diagnostic) et le MS2 (Abbott), améliorent le temps de réponse qui est compris entre 3 et 5 heures ; les autres (Abac-API system) nécessitent un délai normal de 18 heures.

4.3.3.5. Étude des associations d'antibiotiques

Souvent, dans les cas d'infection grave (septicémie, endocardite), on recherche des associations d'antibiotiques bactéricides pour éviter l'apparition d'une éventuelle résistance et détruire totalement le foyer infectieux.

Les antibiotiques peuvent être classés en 2 groupes. L'action d'une association de 2 antibiotiques peut être :

– supérieure à l'action de chaque antibiotique isolé, il y a synergie (gr 1 + gr l) ;

– égale à l'action de chaque antibiotique isolé, il y a indifférence (gr 2 + gr 2) ;

– inférieure à l'action de chaque antibiotique isolé, il y a antagonisme (gr 1 + gr 2).

Pour étudier l'effet d'une association d'antibiotiques, on utilise soit une technique en milieu liquide (on réalise une série de dilutions variables des 2 antibiotiques), soit une technique de diffusion sur gélose (plus rapide et plus simple) ; on fait diffuser les 2 antibiotiques à partir de 2 bandes de papier-filtre imprégnées et disposées à angle droit (méthode de type Chabbert) et l'on observe directement l'effet de l'association *(fig. V.24)*. On peut envisager les éventualités suivantes :

– une association de 2 antibiotiques bactéricides a une chance d'être synergique ;

– une association d'un antibiotique bactériostatique et d'un antibiotique bactéricide risque d'être antagoniste ;

– une association de 2 antibiotiques bactériostatiques est le plus souvent indifférente.

En associant les antibiotiques, le clinicien visera l'un des objectifs suivants :

– obtenir une bactériostase plus rapide ou transformer une action bactériostatique en action bactéricide ;

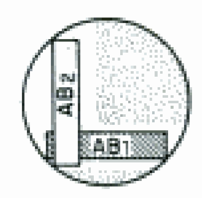
– élargir le spectre d'activité (dans le cas d'infections multiples) ;

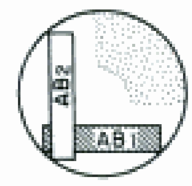
– retarder ou empêcher l'apparition d'une résistance ;

– supprimer les effets secondaires ou toxiques (par diminution des doses administrées) ;

– atteindre différents foyers d'infection par l'emploi d'antibiotiques aux affinités tissulaires différentes.

Dans les infections graves (septicémie, endocardite, etc.), on utilisera habituellement des associations synergiques, donc plus puissantes, et le plus souvent bactéricides. Un traitement fondé sur une association d'antibiotiques peut toutefois conduire à un échec dû à un antagonisme qui n'aurait pas été détecté ou connu (pénicilline + chloramphénicol), ou à une résistance croisée (si 2 antibiotiques sont connus pour présenter une résistance croisée, lorsque l'un paraît inactif l'autre le sera aussi), ou encore à l'addition de certains effets toxiques. Une bonne connaissance des mécanismes d'action permet souvent de prévoir et d'expliquer les antagonismes. Ainsi, dans l'antagonisme pénicilline-chloramphénicol, on sait que la pénicilline inhibe la synthèse de la paroi mais n'affecte pas le métabolisme général, ce qui doit conduire à





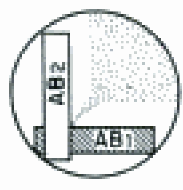


Figure V.24 – Effets de l'action conjuguée de deux antibiotiques (AB_1 et AB_2) sur une souche sensible.

a : effet d'addition (le plus courant) ;

b : effet de synergie (le plus intéressant) ; l'action de chaque antibiotique est augmentée par la présence de l'autre antibiotique ;

c : effet antagoniste (dangereux pour le malade), les effets des deux antibiotiques s'annulent.

Copyrighted material

l'éclatement des bactéries ; mais le chloramphénicol, en freinant la synthèse des protéines, empêche la croissance et donc la lyse des bactéries.

4.3.3.6. Conclusion

Toutes les techniques qui viennent d'être décrites concernent l'activité de l'antibiotique *in vitro*. La transposition des résultats *in vivo* repose sur le principe selon lequel les réactions des bactéries vis-à-vis de l'antibiotique ne diffèrent pas dans les deux cas et que les conditions de leur croissance (pH, pression osmotique, oxygénation, matières organiques, etc.) sont approximativement semblables.

Par ailleurs, l'usage des antibiotiques en thérapeutique exige de bien connaître leurs propriétés pharmacologiques (pénétration, diffusion, élimination) et leurs effets toxiques par des études sur l'animal. Il faut enfin tenir compte du terrain, c'est-à-dire du malade lui-même, de sa tolérance et de ses insuffisances (rénales, respiratoires, cardiaques, etc.).

4.3.4. Antibiotiques et conservation des aliments

Dans l'industrie alimentaire, il est quelquefois nécessaire d'employer des antibiotiques. Leur utilisation est soumise à une législation, donc à une limitation. Les principaux antibiotiques employés comme conservateurs alimentaires sont la nisine, la subtiline, la pimaricine et la tylosine.

- **Nisine**. C'est le nom collectif d'un groupe de polypeptides parmi lesquels on peut distinguer les nisines A, B, C et D, produites par *Str. lactis*. La nisine est active sur les espèces des genres *Streptococcus, Bacillus, Corynebacterium, Clostridium, Lactobacillus*. Elle a été utilisée tout d'abord au cours de la préparation des fromages pour prévenir les fermentations indésirables et, en particulier, la fermentation butyrique. Son emploi comme préservateur dans de nombreux types de conserves s'est assez largement répandu.
- **Subtiline**. La subtiline est un antibiotique de nature polypeptidique isolé de souches sélectionnées de *B. subtilis*. Son activité s'exerce surtout vis-à-vis des bacilles à Gram positif et de certains bacilles à Gram négatif. Son action sporostatique la fait utiliser dans les conserves pour prévenir la germination des spores et le développement des *Clostridium* pathogènes *(Cl. botulinum)*.
- **Pimaricine**. Isolé de *Stm. notalensis*, cet antibiotique possède une structure qui l'apparente au groupe des macrolides. Son activité est fongistatique et fongicide dans une large zone de pH (de 3 à 9) et à des concentrations faibles. Son addition à de nombreux produits alimentaires (fruits, légumes, jus de fruits, fromages) donne d'excellents résultats sans modifier leurs qualités.
- **Tylosine**. Cet antibiotique a été assez récemment découvert (1961). Il est produit par des souches de *Stm. fradiae*. Son hydrolyse donne naissance à un sucre, le mycarose, et à la desmycosine, un antibiotique de structure complexe et de même activité. La tylosine est active sur les bactéries à Gram positif, certaines bactéries à Gram négatif et les bacilles acidorésistants. Son pouvoir sporicide permettrait de réduire les températures de traitement de certaines conserves.

5. Résistance aux agents antimicrobiens

La résistance des micro-organismes vis-à-vis des agents destinés à les combattre pose de graves problèmes, surtout dans le domaine médical et, plus particulièrement, en milieu hospitalier où, souvent, 99 % des souches isolées présentent des résistances. Depuis la fin de la Seconde Guerre mondiale, la résistance aux antibiotiques apparaît comme une évolution inéluctable. La résistance peut être constitutive du germe ou acquise par lui au cours de son développement.

5.1. Phénomène de résistance

Pour qu'un antibiotique soit actif, un certain nombre de conditions doivent être remplies : il doit, en premier lieu, pénétrer dans la cellule ; il doit ensuite rencontrer le récepteur ou la cible moléculaire de son action pour la modifier ou la perturber ; enfin, au cours de son contact avec la cellule, il ne doit subir aucune transformation susceptible de l'inactiver.

Ainsi, un micro-organisme est dit **résistant** lorsque, pour l'une des raisons évoquées, il est capable de se développer en présence d'un taux d'antibiotique significativement plus élevé que le taux habituel. La notion de **résistance clinique**, elle, est corrélative d'un échec thérapeutique ; elle n'a qu'une signification arbitraire, par rapport au malade ; elle n'a aucun sens à l'échelle microbienne.

5.1.1. Déterminisme génétique

Un micro-organisme peut présenter une résistance naturelle vis-à-vis de certains antibiotiques.

Copyrighted material

Il s'agit d'un caractère chromosomique qui correspond à une propriété de l'espèce et qui peut être retenu comme critère d'identification. Les *Klebsiella*, par exemple, sont toujours résistantes à l'ampicilline. Cette propriété génétique sera transmise de génération en génération (sauf mutation).

L'expression de la résistance est un phénomène contrôlé génétiquement. Le caractère de résistance est gouverné par des gènes localisés dans deux types de molécules d'ADN : le **chromosome**, vecteur des propriétés héréditaires du micro-organisme, et des éléments **extrachromosomiques** étrangers ou plasmides, que peut acquérir la bactérie par un mécanisme de transfert tel que la transduction ou la conjugaison.

5.1.1.1. Résistance chromosomique

Dans toute population bactérienne suffisamment importante, sensible à une concentration donnée d'antibiotique, il existe naturellement des cellules qui sont, au contraire, résistantes à la même concentration de l'antibiotique : ce sont des mutants. Les mutations ont des caractères très particuliers qui sont étudiés au chapitre VI.

Ce sont des événements **rares**. Le taux de mutation varie de 1.10^{-7} à 1.10^{-10}. Il dépend tout d'abord de l'antibiotique : il est particulièrement élevé avec la streptomycine, les rifampicines, l'acide nalidixique, l'isoniazide. Il dépend aussi de l'espèce microbienne. Le nombre de mutants risque d'être d'autant plus élevé que la population considérée est grande (infections localisées, généralisées).

La mutation est un phénomène **spontané** et plusieurs types d'expérimentations le démontrent. L'antibiotique n'intervient que comme agent de sélection en éliminant les populations sensibles et en laissant subsister et croître les mutants résistants. La vitesse de sélection dépendra essentiellement du milieu où se déroule le phénomène : dans les infections urinaires par exemple, l'urine étant un véritable bouillon de culture, les mutants résistants peuvent remplacer la population sensible en l'espace de 24 heures.

L'événement est **spécifique** et **indépendant**. Le mécanisme de résistance étant d'ordre biochimique, la résistance s'applique à tous les antibiotiques d'une même famille : aminosides, macrolides, etc. C'est ce qu'on appelle la résistance croisée. Pour des antibiotiques de familles et donc de compositions très différentes, la résistance est au contraire indépendante : la mutation conférant la résistance à un antibiotique A se produit indépendamment de l'antibiotique B. Cela signifie en clair que si la fréquence de mutation pour les deux antibiotiques A et B est respectivement de 1.10^{-6} et 1.10^{-7}, elle sera de 1.10^{-13} pour les deux antibiotiques associés. On comprend, dès lors, l'intérêt considérable en thérapeutique d'empêcher ou de limiter l'apparition de mutants. On tente d'y parvenir en introduisant et en maintenant dans l'organisme un niveau élevé de produit ou, mieux encore, en utilisant des associations d'antibiotiques.

Le phénomène revêt divers aspects selon l'antibiotique. Avec la streptomycine, la résistance survient en une seule étape. On la qualifie de résistance en **un seul échelon** : dans une population mise au contact de la streptomycine apparaissent en même temps plusieurs types de mutants ayant d'emblée une faible, une moyenne ou une très haute résistance. Avec d'autres antibiotiques comme la pénicilline et le chloramphénicol, la résistance se présente en **multiples échelons**. Les mutants du premier échelon ont une résistance modérée puis, dans cette population de mutants, sont sélectionnés des mutants de deuxième échelon ayant une résistance plus élevée, etc. À chaque étape, les mutants qui apparaissent sont résistants à des concentrations de plus en plus fortes d'antibiotique.

5.1.1.2. Résistance extrachromosomique

L'apparition, en clinique, de bactéries résistant simultanément à plusieurs antibiotiques a conduit les bactériologistes à reconnaître un autre type de résistance : celle contrôlée par des éléments extrachromosomiques ou plasmides. Leur étude a été envisagée dans le chapitre II. Ce mode de résistance a été découvert par des chercheurs japonais surpris de voir se manifester dans leur pays, entre 1951 et 1962, une recrudescence importante de dysenterie bacillaire. Cette maladie paraissait pourtant définitivement vaincue depuis 1948 à la suite de l'utilisation des sulfamides. Les *Shigella*, antérieurement sensibles aux agents chimiothérapeutiques, se montraient multirésistantes, dans une proportion pouvant atteindre 40 %, aussi bien

Copyrighted material

que. Une production accrue de la cible de l'antibiotique faisant en sorte que la concentration active de ce dernier ne soit plus atteinte est également une réponse possible de la cellule.

5.2. Évolution de la résistance

5.2.1. En médecine

L'apparition de la résistance *(fig. V.26)* a de profondes incidences en médecine puisqu'elle peut être la cause d'échecs thérapeutiques ou de rechutes.

Son rôle est aussi néfaste en épidémiologie puisque les germes ayant acquis cette résistance au cours d'un traitement peuvent être transmis d'un individu à un autre. Ses manifestations sont variées parmi les micro-organismes : certains, comme les *Staphylococcus* ou les coliformes, deviennent rapidement résistants, d'autres, comme les *Streptococcus* ou les pneumocoques, acquièrent plus rarement la résistance. L'isolement de bactéries « résistantes à tout » devient une réalité quotidienne dans certains secteurs hospitaliers dits à haut risque. Une antibiothérapie mal adaptée, favorisant la sélection de mutants résistants ou la propagation de plasmides, en est la cause évidente.

Pour illustrer ces problèmes, examinons le cas bien connu de la résistance des *Staphylococcus* et de son évolution au cours de l'utilisation des antibiotiques. Dès l'apparition de la pénicilline, les

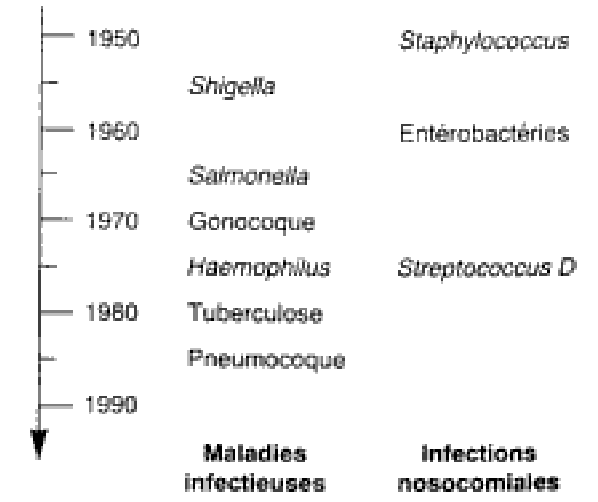


Figure V.26 – **Date d'apparition de quelques résistances microbiennes.**

médecins sont surpris de constater une augmentation progressive des souches de *Staphylococcus* résistantes alors que leur résistance naturelle est exceptionnelle. En 1946, 14 % des souches sont résistantes, en 1947, 38 % et, en 1950, la majorité des souches ont acquis une résistance. Cette tendance est beaucoup plus prononcée dans les collectivités hospitalières, dans les crèches et les dans écoles que dans les foyers individuels ou encore en zone rurale.

La mise au point de pénicillines semi-synthétiques, résistantes aux pénicillinases, ainsi que celle des dérivés de la céphalosporine C a été suivie d'une évolution comparable. Cette résistance croisée touche actuellement plus de 40 % des souches isolées en milieu hospitalier. Ce phénomène, non spécifique aux β-lactamines, concerne aussi la streptomycine, le chloramphénicol, la tétracycline et la kanamycine, antibiotiques qui, parallèlement à leur utilisation thérapeutique, ont vu successivement une diminution progressive de leur efficacité. La gentamycine et la tobramycine, longtemps utilisées comme antibiotiques de première intention dans le traitement des staphylococcies, sont actuellement moins efficaces, surtout depuis la sélection, à partir de 1975-1976, de souches portant des plasmides de résistance. L'emploi plus modéré de la fosfomycine, de la novobiocine, de l'acide fusidique et de la rifampicine, en limitant la sélection de mutants résistants, semble être à l'origine du maintien de leur efficacité sur *St. aureus*. Dans ces conditions, les molécules actives vis-à-vis des *Staphylococcus* deviennent limitées en nombre. Il s'agit surtout des synergistines, de la fosfomycine et de la vancomycine.

Les degrés de résistance sont cependant très variables d'un groupe de micro-organismes à l'autre.

5.2.2. Effets secondaires de la résistance

L'antibiothérapie par voie générale peut entraîner des modifications profondes au niveau des flores microbiennes mixtes de certains organes : du rhino-pharynx ou du tube digestif. Les conséquences en sont fâcheuses, quelquefois graves. Ainsi, dans l'intestin, cohabitent de nombreuses espèces qui ont un rôle propre et qui assurent, par exemple en synthétisant des facteurs de croissance, un certain équilibre biologique. L'élimination des espèces sensibles à la suite d'un traitement conduit à un déséquilibre et à des troubles digestifs

Copyrighted material

généralement mineurs. Ce syndrome a souvent été décrit sous le nom de diarrhée par antibiotique. Une espèce dangereuse peut être sélectionnée. Il s'agit de *Cl. difficile*, responsable de la colite pseudo-membraneuse par production d'une toxine cytolytique.

5.2.3. Écologie des facteurs de résistance

La nature plasmidique de la résistance a été observée pour la plupart des antibiotiques majeurs ou à large spectre. Les facteurs de résistance se rencontrent chez de très nombreuses espèces bactériennes hébergées naturellement par l'homme ou l'animal (flores intestinales, rhinopharyngées, etc.). Ils sont communs chez toutes les entérobactéries. On les isole chez les *Pseudomonas*, les *Aeromonas*, les Vibrions, les *Pasteurella*, etc. La résistance, si fréquente chez les *Staphylococcus*, est, dans la quasi-totalité des cas, d'origine plasmidique.

La menace que représente l'évolution du phénomène de résistance est directement liée au pouvoir infectieux des plasmides chez l'homme, l'animal et dans leur environnement. Pour s'en rendre compte, il est nécessaire d'analyser et de classer ces plasmides afin d'en reconnaître la diffusion et l'extension. Dans certains cas *(S. panama)*, les types plasmidiques paraissent relativement spécifiques. Dans d'autres, au contraire, ils sont isolés très communément parmi les entérobactéries et peuvent donner naissance à de véritables épidémies plasmidiques.

La propagation de ces plasmides, très étudiée dans les flores humaines ou animales, est moins bien connue dans l'environnement. À cet égard, l'eau, milieu universel, peut jouer un rôle éminemment favorable ou défavorable. La plupart des études mettent en évidence une certaine accumulation des bactéries résistantes dans le milieu aquatique. Ainsi le taux des entérobactéries résistantes, qui se situe aux environs de 0,1 à 1 % dans les matières fécales humaines en l'absence de traitement antibiotique, serait de 10 % dans les eaux usées, de 50 % dans les eaux de surface et de plus de 80 % dans les eaux d'alimentation. Ces taux pourraient traduire l'existence d'une forte pression sélective dans l'environnement aquatique. Diverses d'hypothèses sont avancées pour l'expliquer : avantage sélectif des bactéries résistantes car multirésistantes aux antibiotiques et à certains métaux lourds ; possibilité de transfert des caractères de résistance d'une souche à l'autre ; présence dans le milieu d'entérobactéries autochtones résistantes aux antibiotiques. Ces hypothèses sont restées jusqu'à présent purement spéculatives.

La résistance aux antibiotiques s'accompagne souvent d'une résistance aux métaux lourds, ce qui pourrait expliquer leur prédominance dans les rejets industriels (toxiques). Ces bactéries résistantes sont capables d'opérer des transformations chimiques (méthylation) à partir des métaux toxiques comme le mercure, le cadmium, le plomb, l'étain. La forme méthylée du mercure, qui s'accumule dans les chaînes biologiques marines jusqu'aux poissons, est de 50 à 100 fois plus toxique que la forme inorganique initiale (Hg^{++}). Il serait du plus grand intérêt de découvrir les mécanismes de ces phénomènes pour mieux comprendre la toxicité des milieux aquatiques et y porter remède.

Pour éviter l'extension de ces phénomènes de résistance en clinique, il convient d'adopter une politique rigoureuse d'utilisation des antibiotiques :

- limiter au strict minimum l'antibiothérapie préventive ;
- opérer un choix judicieux de l'antibiotique actif en thérapeutique, de préférence à spectre étroit ;
- éviter l'abus des associations d'antibiotiques non justifiées (hormis pour les infections graves) ;
- prescrire plutôt l'antibiotique le plus ancien pour garder en réserve les molécules plus récentes destinées aux cas graves.

6. Notion sur les antifongiques

6.1. Généralités

De toutes les infections microbiennes de l'homme, les mycoses, et plus particulièrement les mycoses profondes, sous-cutanées ou viscérales, restent encore celles dont l'évolution, souvent chronique et parfois mortelle, est la plus difficile à modifier. Devenues très préoccupantes, elles exigent des médications antifongiques efficaces, douées d'effet fongistatique et fongicide, diffusant parfaitement dans les tissus, faciles à administrer et bien tolérées. Parmi les milliers d'agents antifongiques actifs *in vitro,* très peu le sont *in vivo* du fait de leur mauvaise diffusion ou de leur toxicité. Pour être active, la substance doit d'abord traverser la paroi cellulaire constituée de chitine, de polyosides, de phospholipides et de stérols (absents chez les bactéries). Par ailleurs, l'organisme réagit à l'agression fongique par la formation de cellules géantes et d'une zone de fibrose autour du champignon. Enfin, certaines mycoses connaissent des localisations profondes dans des territoires peu vascularisés et difficilement accessibles comme le tissu nerveux *(Cryp-*

Copyrighted material

mans, pathogènes dimorphes infectieux sous forme de levures.

• La **griséofulvine** (Davies, 1980), d'abord commercialisée comme fongicide (1939) pour les végétaux *(fig. V.27)*. C'est un métabolite de certains isolats de *Penicillium* spp. *(fig. V.30)* et notamment de *Pe. griseofulvum,* d'où elle tire son nom. Elle inhibe la mitose en interférant avec la protéine associée aux microtubules, empêchant ainsi l'assemblage et la fonction normale du

Figure V.27 – **Nystatine et griséolfuline.**

Figure V.28 – **Antifongiques synthétiques.**

a : tolralfate ; b : flucytosine ; c : clotrimazole ; d : miconazole.

Copyrighted material

microtubule. Parmi les champignons pathogènes pour l'homme, elle inhibe uniquement les membres des genres *Epidermophyton, Microsporum* et *Trichiphyton*. Elle reste un agent utile pour le traitement des teignes du cuir chevelu.

• L'**amphotéricine B** (Gold *et al.*, 1956), considérée actuellement comme « le » traitement chimiothérapeutique intraveineux majeur des infections fongiques profondes. Appartenant comme la nystatine à la famille des polyènes, elle a été retrouvée dans les filtrats de culture provenant de *Stm. nodosus,* associée à une autre molécule moins efficace, l'amphotéricine A *(fig. V.28)*. Son efficacité s'est avérée près de 10 fois supérieure à celle de la nystatine, et ce sans augmentation concomitante de la toxicité lors de son administration intraveineuse à des animaux. Son spectre englobe la plupart des espèces pathogènes. Cependant, son utilisation reste associée à des effets secondaires indésirables (toxicité rénale notamment).

• Les **antifongiques synthétiques** *(fig. V.28)*. Le tolnaftate (breveté en 1963), de spectre limité aux dermatophytes, est un inhibiteur de la voie de biosynthèse des stérols. La flucytosine, initialement connue comme agent cytostatique anticancéreux, est un inhibiteur de la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Les imidazoles (clotrimazole, miconazole), à spectre très large, sont des inhibiteurs de la déméthylation du lanostérol en ergostérol, activité favorisée par leur affinité de liaison spécifique au cytochrome P450 des champignons plutôt qu'à ceux des mammifères. Les allyamines (naftifine, terbinafine) *(fig. V.29)*, à spectre très large (dermatophytes, *Candida* spp., moisissures), sont hautement efficaces contre les dermatophytoses.

• Les **nouveaux antifongiques d'origine naturelle**. Ce sont tous, pour l'instant, des produits de fermentation. Ainsi, les échinocandines, lipopeptides cycliques produits par des isolats d'*Aspergillus,* les nikkomycines, métabolites de *Stm. tendae,* nucléosides peptides inhibant la synthèse de la chitine chez *Candida* spp., *Blastomyces dermatitidis* notamment, les pradimicines, dérivés de l'antibiotique pradimicine A, métabolite produit par *Actinomadura hibisca,* formant des complexes avec les polysaccharides de mannane de la paroi cellulaire fongique.

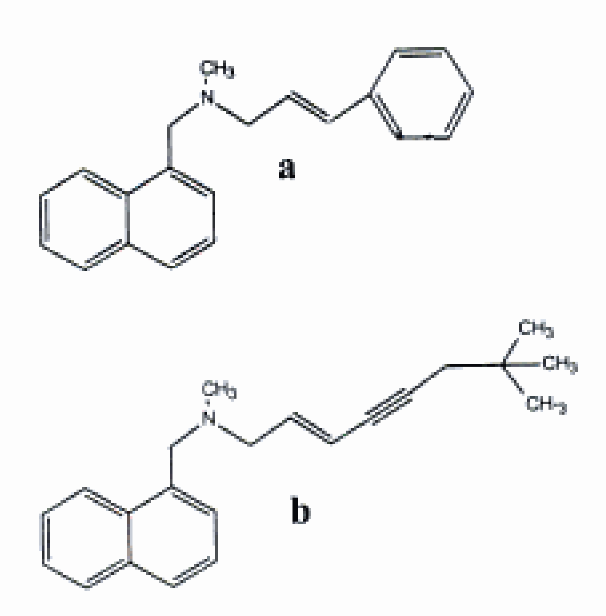


Figure V.29 – Naftifine et terbinafine.

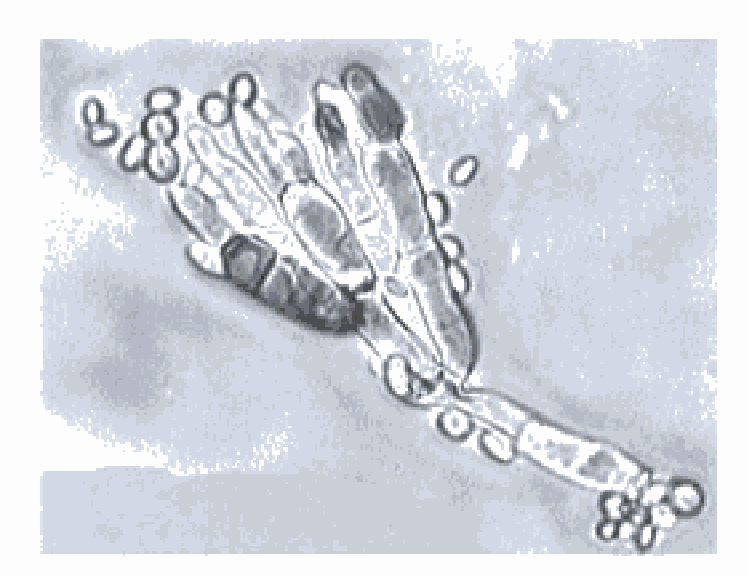


Figure V.30 – Penicillium.

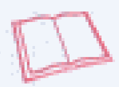
(Avec l'aimable autorisation de M. Kriat, Martseille.)

6.3. Résistance antifongique

Pendant de nombreuses années, aucune surveillance systématique des tendances à la résistance n'a été mise en place. De même, peu d'efforts ont été consentis afin de standardiser les méthodes de détermination de la CMI. C'est à partir des années 1980 et de l'émergence de *Ca. lusitaniae* comme résistant à l'amphotéricine B que des études sérieuses sur la résistance aux antifongiques ont commencé à être menées. Ainsi les premiers isolats de *Ca. albicans* résistants au kétoconazole ont été identifiés et la résistance croisée de ces souches à d'autres azolés a

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

1. Définir et classer les agents antimicrobiens.

2. En fonction du temps, quelle est l'évolution d'une population microbienne soumise à l'action d'un agent antimicrobien ?

3. Donner une définition de la stérilisation et de la stabilisation d'une denrée ou d'un milieu.

4. Décrire les procédés de stérilisation par la chaleur humide et la chaleur sèche.

5. Expliquer comment sont déterminés les barèmes de stérilisation et de pasteurisation.

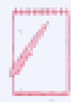
6. Décrire un dispositif de filtration, en donner les principales indications.

7. Expliquer l'action antimicrobienne des rayons ultraviolets, β et γ.

8. Décrire des exemples d'applications dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques.

9. Définir les termes « antisepsie » et « désinfection ».

10. Classer les antiseptiques et les désinfectants en fonction de leur mode d'action.



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes.

1. La………… est l'opération qui a pour objet de tuer tous les………………………

2. Un milieu est dit……………… lorsqu'il contient des micro-organismes.

3. Une substance est……………………….. ou……………………… lorsqu'elle possède la propriété d'inhiber momentanément la……………….. des bactéries ou des champignons.

4. Une substance est………. lorsqu'elle détruit totalement les bactéries, ………… si elle détruit les champignons, ……………….. dans le cas des virus.

5. On appelle………….. (F_t) le temps requis (entre 100 et 130 °C) pour obtenir une………………….. effective.

6. L'hypochlorite de sodium est mieux connu sous le nom………………

7. L'inhibition compétitive est le mode d'action antibactérien de certaines substances appelées……………..

8. La……………… est un procédé récent surtout appliqué au lait pour obtenir une longue conservation.

9. Les antibiotiques sont susceptibles d'être dégradés par………………

10. ………………….. est une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe……………. pour faire agir de la………………

11. On peut grouper les antibiotiques en fonction de leur………………

12. Les pénicillines et les………………………… sont caractérisées par un cycle………….. qui inhibent la synthèse de la……………

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. Si 10 minutes d'autoclave à 120 °C suffisent pour stériliser un milieu, tout milieu traité dans les mêmes conditions sera stérile.

2. Un produit UHT est stérile.

3. Les rayons UV ne peuvent stériliser que des milieux transparents sur une faible épaisseur.

4. L'eau de Javel perd son activité à l'usage.

5. Le savon est bactéricide.

6. La fumigation est la meilleure façon de désinfecter une pièce.

7. Tous les antibiotiques découverts sont utilisables en thérapeutique.

8. La CMB correspond à une destruction partielle des micro-organismes.

9. Le traitement avec un antibiotique d'une souche résistante par plasmide est plus difficile que si la résistance est d'origine chromosomique.

10. On peut réaliser un antibiogramme en 3 heures.



2.2. Dans le tube 0, la croissance est normale (tube témoin). Dans le tube 2, l'antibiotique est bactériostatique. Dans le tube 5, l'antibiotique est bactéricide.
Définir les termes « bactériostatique » et « bactéricide ».
Tracer de façon théorique, et sur le même graphique, l'évolution de la croissance en fonction du temps pour les tubes 1, 2, 3 et 5 et commenter brièvement ces courbes.

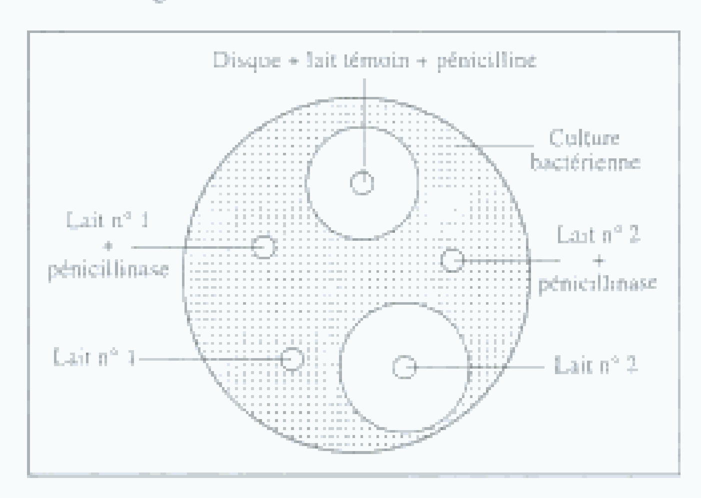
9. Recherche et étude d'un antibiotique

1. Pour recherche la présence d'un antibiotique (la pénicilline) dans des laits destinés à l'alimentation humaine, on utilise la méthode des disques (diffusion en gélose).

1.1. Pourquoi doit-on rechercher la présence d'antibiotiques dans un lait ?

1.2. Donner le principe de la méthode utilisée.

1.3. Une souche de *B. stearothermophilus*, sensible à la pénicilline, est introduite dans un milieu gélosé glucosé et coulé en boîte de Pétri. Des disques de papier sont imprégnés d'un lait témoin additionné de pénicilline et des laits n° 1 et n° 2 à analyser, puis disposés sur la gélose. Après 2 h 30 d'incubation à 37 °C, on obtient les résultats présentés sur la figure.



1.3.1. Quel est l'intérêt du disque témoin ?

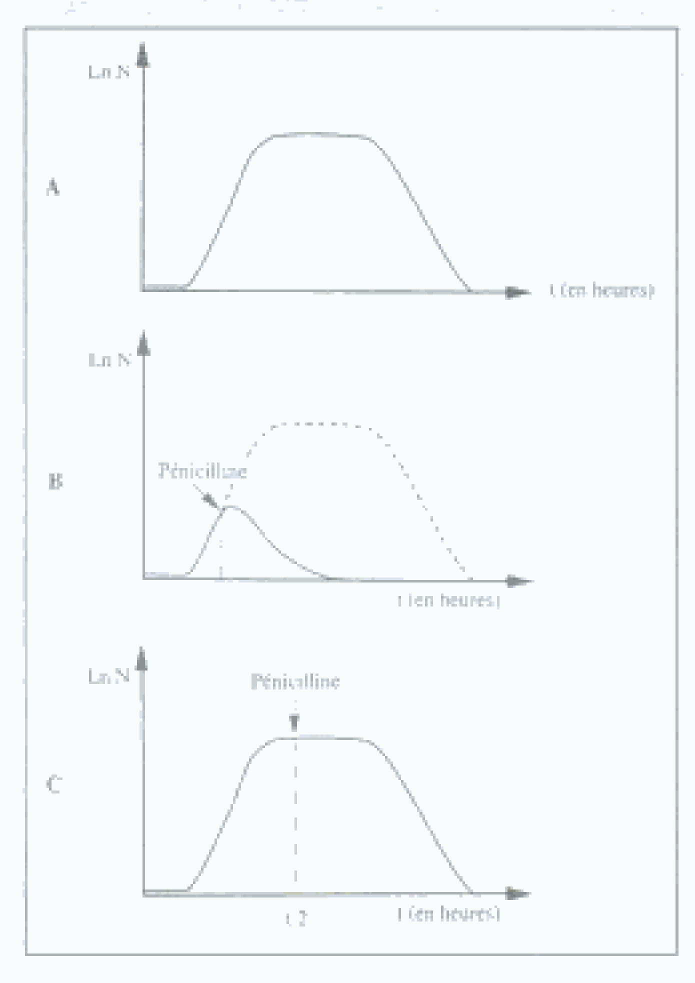
1.3.2. Quel est le rôle de la pénicillinase ?

1.3.3. Interpréter les résultats obtenus pour les laits n° 1 et n° 2.

2. On veut étudier l'action de la pénicilline sur *B. stearothermophilus*. Dans une culture de *Bacillus* en milieu liquide, on mesure le nombre N de bactéries par millilitre de milieu en fonction du temps.

2.1. On trace la courbe LnN = *f(t)*. Elle est donnée en A ci-dessous. La commenter et l'analyser.

2.2. On ajoute de la pénicilline à la culture :
– au temps t_1, et on obtient le tracé de croissance de la figure B (trait plein) ;
– au temps t_2, et on obtient le tracé de la figure C (trait plein).
Analyser ces courbes.

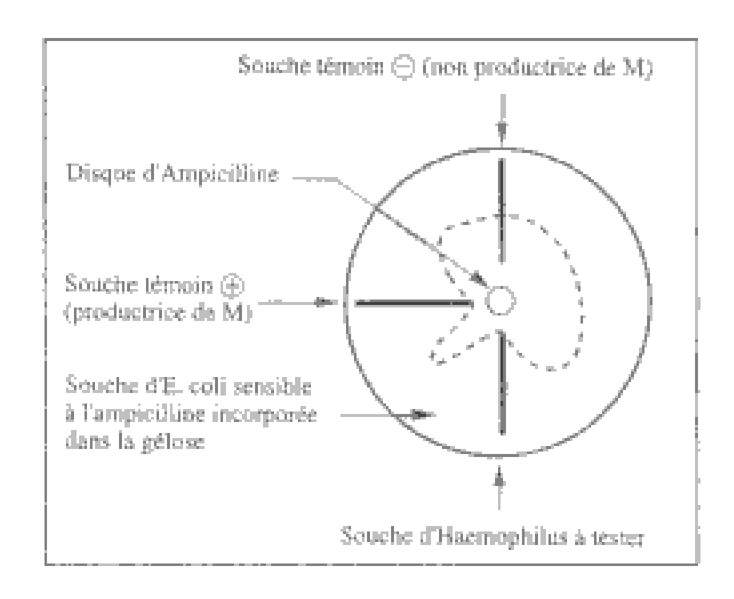


2. Donner les caractéristiques de cette résistance et les conséquences de ce phénomène pour l'antibiothérapie.

3. Quel type de molécule (M) produite par la bactérie peut être responsable de cette résistance acquise ? Préciser son rôle.

4. Afin de détecter rapidement la capacité de produire cette substance M, on peut pratiquer le test de Gots ci-dessous.

Interpréter le résultat obtenu avec la souche à tester.



Copyrighted material

CORRIGÉS

1. Compléter par

1. Stérilisation ; micro-organismes.
2. Septique.
3. Bactériostatiques ; fongistatiques ; multiplication.
4. Bactéricides ; fongicides ; virucides.
5. Valeur stérilisante ; stérilisation.
6. D'eau de Javel.
7. Antimétabolites.
8. Pasteurisation UHT.
9. Voie enzymatique.
10. L'autoclave ; de l'eau sous pression ; vapeur d'eau saturée.
11. Site d'action ou mode d'action ou composition chimique.
12. Céphalosporines ; β-lactame ; paroi.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : cela dépend aussi de l'intensité de la contamination initiale et de la nature ainsi que de la quantité du milieu.
2. Faux : il reste des spores en particulier celles des bactéries thermophiles.
3. Vrai.
4. Vrai.
5. Faux : il a surtout un effet mécanique qui entraîne les microbes par la mousse.
6. Vrai à condition d'utiliser un produit adapté à cette fonction comme le formol.
7. Faux : beaucoup sont trop toxiques ou ont des effets secondaires indésirables pour l'organisme.
8. Vrai.
9. Faux : elle est équivalente sauf qu'elle est souvent accompagnée d'une résistance à d'autres antibiotiques.
10. Vrai.

3. Antibiogramme

1. Milieu Muller-Hinton.
2. Il faut une souche pure, jeune (environ 18 heures de culture) de densité cellulaire correcte (on doit obtenir des colonies denses mais non confluentes) (voir chap. V, § 4.3.3.3).
3. Pen et Nal : intermédiaire, les autres antibiotiques : sensibles.
4. Sensible : souche pouvant être atteinte par le traitement aux doses supportables par l'organisme. Résistante : souche ne pouvant pas être atteinte par le traitement aux doses supportables par l'organisme (voir chap. V, § 4.3.3.3).
5. CMI : voir chap. V, § 4.3.3, les courbes de concordance donnent les relations entre les CMI et les diamètres des zones d'inhibition, CMI = 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

4. Action du chloramphénicol

1.1. Subculture par la méthode des dilutions. On utilise le plus souvent une gélose à l'œuf qui permet de bien neutraliser les effets des substances antibactériennes et assure ainsi une bonne reprise de la croissance des bactéries survivantes.

1.2. Tubes 1 à 5 : effet bactériostatique de plus en plus important (il y a plus de bactéries que dans l'*inoculum*) ; tubes 6 à 10 : effet bactéricide de plus en plus marqué (il y a moins de bactéries que dans l'*inoculum*) (voir chap. V, § 4.3.3).

1.3. Définition CMI, voir chap. V, § 4.3.3. ; CMI = 3,75 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

2. Dans le tube 9, la destruction du chloramphénicol permet aux rares bactéries survivantes de se développer ; dans le tube 10, soit la concentration plus forte en chloramphénicol a détruit la totalité des bactéries et il ne peut y avoir reprise de culture, soit il reste suffisamment d'antibiotique (par hydrolyse partielle) pour empêcher la reprise de la culture.

5. Étude de l'action de la pénicilline sur *Listeria monocytogenes*

1. C'est une β-lactamine agissant sur la synthèse de la paroi.
2. Courbe P : en rajoutant de la pénicilline en phase exponentielle, les bactéries se lysent car la pénicilline, empêchant la synthèse de paroi lors de cette phase, entraîne la formation de protoplastes instables dans un milieu non adapté à leur survie. Courbe P' : en rajoutant de la pénicilline en phase stationnaire, aucune action car il n'y a plus synthèse de paroi au cours de cette phase.
3. La pénicilline agit au niveau de l'incorporation des précurseurs de type muramyl peptides dans la paroi existante (voir chap. V, § 4.3.2.1).
4. L'origine de cette résistance peut-être chromosomique (mutations) ou plasmidique (acquisition d'un plasmide de résistance codant par exemple pour une pénicillinase) (voir chap. V, § 5.1.1).

6. Étude du traitement de la listériose

1. Antibiotiques. Pénicilline G : famille des β-lactamines ; noyau β-lactame associé à un noyau thiazolidine donnant l'acide 6 amino-pénicillinique. Gentamycine : famille des aminosides
2. Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par analogie structurale du noyau β-lactame avec le dipeptide Dala-Dala (liaison interpeptidique entre les chaînes).
3. Représentation graphique, voir fig. V-20. Activité bactériostatique : ralentissement de la croissance N < N sans antibiotique. Activité bactéricide : $N < N0$ sans antibiotique et baisse lyse cellulaire.

7. Étude de la résistance aux antibiotiques de *St. aureus*

1. Voir chap. V, § 4.1.

2. Céphalosporine agissant sur la paroi, tétracyclines agissant sur la synthèse protéique au niveau des ribosomes (voir chap. V, § 4.3.2).

3. Par des plasmides de résistance (correspond à un ADN circulaire extrachromosomique), ils sont transmis entre bactéries par conjugaison (voir chap. V, § 5.1.1.2).

4. (d) indifférence ; (e) synergie ; (f) antagonisme.

L'association (e) est intéressante car elle permet de diminuer les doses administrées pour un même effet sur la souche, l'association (f) est à proscrire car elle conduira à un échec thérapeutique (résistance de la souche).

8. Étude de la sensibilité du staphylocoque à la pénicilline G

1. La pénicilline G est une β-lactamine qui agit par inhibition de la biosynthèse de la paroi au niveau de l'incorporation des précurseurs (voir chap. II, § 2.2.5) alors que le lysozyme détruit les liaisons β 1-4 des chaînes polyosidiques du peptidoglycane de la paroi en place.

2.1. Tube 3 : correspond à la CMI puisqu'il n'y a plus de développement (voir chap. V, § 4.3.3) ; valeur : $1 mg \cdot mL^{-1}$.

2.2. Bactériostatique : inhibition de la culture en diminuant la vitesse spécifique de croissance. Bactéricide : destruction plus ou moins totale des bactéries (voir chap. V, § 4.3.3) ; courbes : voir fig. V-21.

9. Recherche et étude d'un antibiotique

1.1. Par suite d'un traitement de la vache, l'antibiotique utilisé peut passer dans le lait où sa présence peut entraîner des troubles graves en cas d'ingestion (diarrhées, allergies…).

1.2. Le disque imbibé de lait va inhiber la culture bactérienne s'il y a présence d'un antibiotique auquel la souche test est sensible (voir chap. V, § 4.3.3.3).

1.3.1 Le disque témoin permet de vérifier la sensibilité de la souche à la pénicilline.

1.3.2. La pénicillinase va détruire la pénicilline en rompant le cycle β-lactame, elle n'a pas d'effet sur la souche.

1.3.3. Lait n° 1 : avec ou sans pénicillinase, il n'y a pas d'inhibition de la culture ; ce lait ne contient pas de pénicilline. Lait n° 2 : sans pénicillinase, il y a une inhibition de la culture ; il y a donc un antibiotique dans ce lait, la pénicillinase fait disparaître cet effet inhibiteur, on peut donc affirmer que l'inhibition était due à de la pénicilline.

2.1. Sur la figure B. de l'exercice, on voit une courbe de croissance en milieu non renouvelé avec les phases de latence, d'accélération, exponentielle, stationnaire et de déclin (cette dernière phase est de type exponentiel et aboutit à la lyse totale de la culture) (voir chap. III, § 3.2.1).

2.2. Au temps t_1 : en rajoutant de la pénicilline en phase exponentielle, les bactéries se lysent car, la pénicilline empêchant la synthèse de paroi, il y a formation de protoplastes instables dans le milieu non adapté à leur survie (hypotonique).

Au temps t_2 : en rajoutant de la pénicilline en phase stationnaire, aucune action car il n'y a plus synthèse de paroi dans cette phase.

10. Plasmides et résistance aux antibiotiques

1.1. Voir chap. V, § 4.3.3.3.

1.2. Résultats de l'antibiogramme :

chloramphénicol et acide nalidixique : sensible ;

ampicilline : intermédiaire ;

polymixine B et tétracycline : résistant.

1.3. CMI : voir chap. V, § 4.3.3.

2.1. Plasmide : ADN extrachromosomique (voir chap. II, § 2.6).

2.2. La multirésistance à toute une série de familles d'antibiotiques, d'où une très grande difficulté pour traiter les malades par antibiothérapie.

2.3. ADN : voir chap. II, § 2.6 et 2.5.2.

11. Contrôle de la production d'un antibiotique

1. Concentrations des solutions étalons en $\mu g/mL^{-1}$: $S_1 = 200$, $S_2 = 100$, $S_3 = 50$, $S_4 = 25$.

2. Courbe représentant les variations du diamètre d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la concentration en bacitracine.

3. Les concentrations en bacitracine de la solution conditionnée testée sont de 61 et 57 $\mu g \cdot L^{-1}$.

12. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

1. Plasmides : voir chap. II, § 2.6.

2. Multirésistance, le plus souvent à mécanisme enzymatique, infectieux entre bactéries (voir chap. V, § 5.1.1.2).

3. M = β-lactamase, rôle d'enzyme de dégradation de cycle β-lactame de l'ampicilline.

4. Le disque d'ampicilline conduit à une zone d'inhibition de la souche sensible d'*E. coli*, cette zone devrait être normalement rigoureusement circulaire. La strie de la souche témoin de productrice de M (β-lactamase), du fait de la destruction de l'ampicilline autour de la strie de culture, permet le développement de la souche d'*E. coli* nettement plus près du disque d'ampicilline ; dans le cas de la souche témoin non productrice, aucune perturbation de la zone d'inhibition n'est visible. La souche d'*Haemophilus* se comporte comme la souche témoin⁺, elle est donc aussi productrice de β-lactamase.

Copyrighted material

Chapitre 6

Génétique

Du point de vue historique, la génétique a franchi trois grandes étapes :

– en 1880, Gregor Mendel, un moine autrichien, publie ses *Essais sur les hybrides naturels*. Ce recueil énonce les lois fondamentales de la génétique. Il montre en particulier que chaque propriété d'une cellule ou d'un organisme est sous la dépendance de facteurs ou déterminants qui, depuis, ont été appelés **« gènes »**. Beaucoup plus tard, en 1910, T. Morgan et G.B. Bridges établissent le rôle probable des chromosomes dans la transmission des caractères : c'est la théorie chromosomique de l'hérédité ;

– les travaux de G. Beadle et E. Tatum, en 1941, effectués sur une moisissure, *Neurospora crassa*, montrent que les gènes gouvernent la formation des enzymes et contrôlent toute l'activité biosynthétique de la cellule, donc toutes les propriétés susceptibles d'apparaître chez celle-ci. D'où le concept **« un gène – une enzyme »**, point de départ d'hypothèses fécondes ;

– en 1944, Avery, MacLeod et MacCarthy reproduisent *in vitro* le phénomène de transformation découvert par Griffith 16 ans auparavant. La substance responsable de la transformation est l'ADN dont on reconnaît ainsi le rôle fondamental en tant que support et vecteur de tous les caractères héréditaires de la cellule. La structure spatiale de cet ADN est confirmée par Crick et Watson en 1952.

La génétique microbienne a pour objet l'étude du génome du micro-organisme, c'est-à-dire des gènes, de leurs variations (génotypiques) et de leur expression phénotypique (déjà analysée dans les chapitres précédents).

Les variations génotypiques comprennent :

– les **mutations**, qui se traduisent dans une population microbienne par l'apparition de cellules différentes de celles du type normal (ou sauvage) par un ou plusieurs caractères ; on appelle ces microbes des mutants ;

– les **recombinaisons**, qui mettent en jeu un échange du matériel génétique après transfert de celui-ci d'une cellule à une autre (par exemple de A vers B) :

- par **transformation** après extraction du matériel génétique de A puis pénétration dans B,
- par **transduction** ; le transfert du matériel génétique est assuré par un bactériophage,
- par **conjugaison** ; le transfert de l'ADN de A vers B est effectué après contact entre les deux cellules.

Au cours des dernières années, des techniques qui permettent d'élargir le champ des recombinaisons génétiques en réalisant de véritables greffes d'ADN entre des espèces très éloignées phylogénétiquement (par exemple, espèce bactérienne et espèce animale) ont été mises au point. La dénomination **« génie génétique »** souligne le caractère prospectif de ces expériences.

Avant d'aborder la description de ces différents phénomènes, il convient de préciser ce que l'on entend par information génétique.

Copyrighted material

1. Information génétique

1.1. Organisation

L'essentiel de l'ADN bactérien est organisé en une seule molécule qu'on appelle le **chromosome**. Ce chromosome est **circulaire** ; il a environ 1 mm de longueur et une masse molaire d'environ 3.10^9 daltons ; il est composé de 2 chaînes polynucléotidiques de polarité inversée dont les éléments sont liés par covalence de même que les extrémités. Le chromosome n'est pas toujours la seule molécule d'ADN présente. La plupart des bactéries portent en effet soit des éléments d'ADN extrachromosomiques qu'on appelle des **plasmides**, soit des virus bactériens ou **bactériophages** impossibles à distinguer des premiers sinon en explicitant la nature de leurs informations.

Ces éléments d'ADN chromosomiques ou extrachromosomiques sous forme CCC *(covalently closed circulare)* sont capables de réplication autonome et de ségrégation au cours de la croissance bactérienne. On les appelle des **réplicons**. Le réplicon chromosomique se distingue des réplicons plasmidiques ou bactériophagiques essentiellement par sa taille. De plus, les éléments extrachromosomiques peuvent quelquefois ne pas se répliquer ou ne pas se distribuer au cours de la bipartition cellulaire.

Tous les réplicons en tant que molécules d'ADN sont porteurs d'information génétique.

La totalité de cette information fait habituellement référence au **génotype** de la cellule bactérienne par opposition au **phénotype** qui représente l'ensemble des caractères, structurels et fonctionnels, observables à un moment donné. Chez la bactérie, la majorité de l'ADN cellulaire est exprimée en toutes occasions, à l'exception des informations qui sont réprimées (voir chap. IV) et qui ne constituent guère plus de 10 % de l'ensemble.

L'information génétique peut être modifiée sous l'effet d'agents physico-chimiques, comme on le verra à propos des **mutations**. Un autre phénomène peut aboutir à un résultat analogue en mettant en jeu un échange réciproque entre chromosomes homologues ; c'est la **recombinaison génétique**.

1.2. Lésion et réparation

La remarquable stabilité des caractères héréditaires dépend de l'intégrité de l'information génétique portée par la double hélice d'ADN. Or, cet ADN est soumis aux multiples contacts des agents physiques et chimiques de l'environnement susceptibles de l'altérer. Pour remédier en permanence aux dommages subis, la cellule met en œuvre des systèmes enzymatiques de réparation. Trois mécanismes sont actuellement connus.

1.2.1. Réparation par excision-resynthèse

L'exposition aux rayons ultraviolets fait apparaître des lésions de l'ADN sous forme de liaisons covalentes entre des couples de bases pyrimidiques (thymine ou cytosine) situés sur le même brin d'ADN. Les dimères de thymine ou de cytosine ainsi constitués entraînent une distorsion locale de la structure en double hélice de l'ADN et une rupture des liaisons hydrogène avec les bases situées du côté opposé.

La réparation par excision-resynthèse *(fig. VI.1)* est un processus fondamental de réparation de l'ADN ; il intervient aussi pour remédier aux dommages provoqués par des substances chimiques mutagènes telles que les hydrocarbures polycycliques, les aminofluorènes ou l'aflatoxine (mycotoxine). Le mécanisme met en jeu une activité endonucléasique en 5' de l'anomalie, puis une action exonucléasique 5' → 3' qui concerne un segment d'environ 12 bases en amont, le remplacement des bases est alors assuré par une activité ADN polymérasique également 5' → 3', une ligase terminant le travail. Trois gènes gouvernent ce mécanisme et sont désignés sous les sigles uvrA, uvrB et uvrC (uv pour ultraviolet, r pour réparation, la formation de ces dimères ayant été pour la première fois mise en évidence à la suite d'une exposition de la bactérie aux UV).

Remarque : chez les bactéries ainsi que chez la levure, un autre système permet de réparer l'anomalie due aux dimères de thymine. Il s'agit du mécanisme dit de photoréactivation *(fig. VI.2)* dans lequel une enzyme inductible par la lumière (la photolyase) coupe le dimère sans toucher au squelette phosphodésoxyribose.

1.2.2. Réparation par recombinaison

Le processus de réparation par excision-resynthèse ne peut être mis en jeu au cours de la réplication de l'ADN. Dans ces conditions, l'ADN polymérase est bloquée au niveau des lésions et la réplication inhibée. La dégénérescence du cycle cellulaire entraîne la mort de la bactérie. Un

Copyrighted material

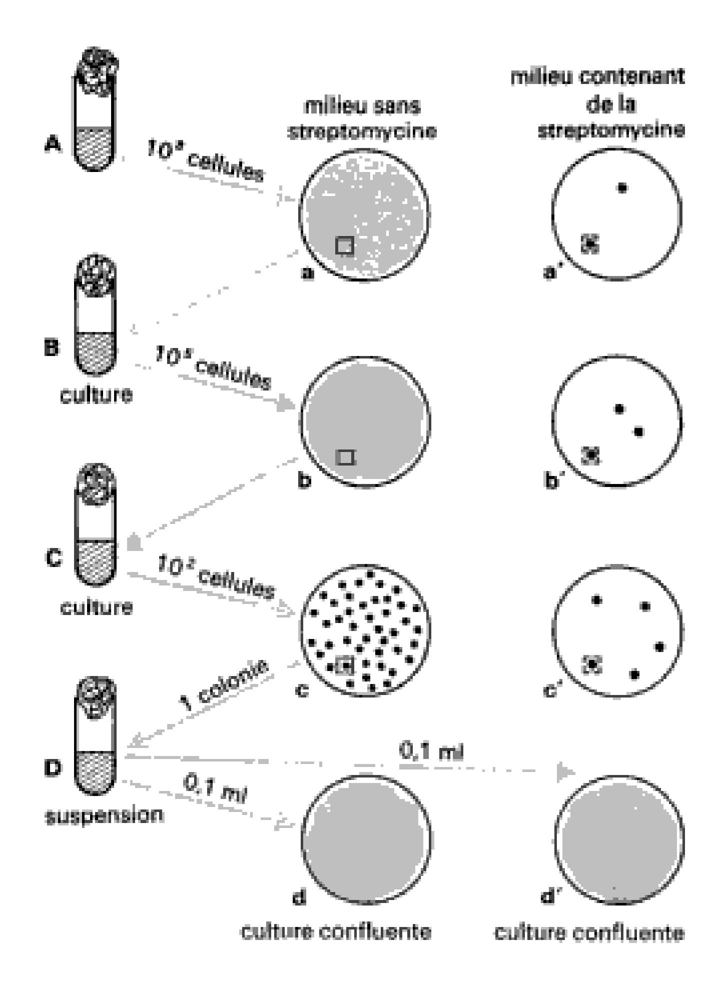


Figure VI.5 – **Expérience de Lederberg destinée à montrer le caractère spontané des mutations.**

Une suspension de bactéries de la culture A sensible à la streptomyine est étalée sur a. Après culture on réplique sur a' et l'on repère les mutants. On prélève, sur a, l'endroit dont ils proviennent et l'on cultive sur B. De nouveau, on en étale une suspension plus faible sur b. Après culture, puis réplique sur b', on prélève à nouveau un morceau de b pour le cultiver sur C. On obtient sur c des colonies sauvages et de mutants. On repère les mutants par réplique sur c'. Finalement une colonie de mutants prélevée sur c est mise en suspension dans le bouillon D. Un inoculum de cette suspension donne une sulture confluente sur d ou d'.

respondant à une de ces colonies sur le milieu d'origine. On le prélève et on l'ensemence sur un nouveau tube de bouillon. Après culture, on étale à nouveau sur un milieu solide sans antibiotique une partie aliquote beaucoup plus faible que précédemment parce que l'*inoculum* contient en principe une plus grande proportion de résistants. On répète la même opération plusieurs fois.

Le fait essentiel qui est démontré par l'expérience est que, à chacune des étapes, le nombre de mutants augmente sur les milieux dépourvus d'antibiotique pour donner finalement une culture pure de germes résistants. Les milieux contenant de la streptomycine ont servi uniquement au repérage des mutants qu'ils ont sélectionnés. Mais la population que nous avons obtenue n'a jamais été, elle, au contact de l'antibiotique, ce qui démontre sans aucune ambiguïté possible que la mutation se produit spontanément, en l'absence de l'agent sélectif, en l'occurrence la streptomycine.

L'expérience qui vient d'être décrite montre que l'apparition des mutants est un phénomène rare. On le définit par le **taux de mutation**, c'est-à-dire la probabilité que la mutation a d'apparaître dans une bactérie dans l'intervalle compris entre deux divisions. Ce taux varie de 10^{-3} à 10^{-20}. Supposons qu'il soit de 10^{-6}, cela signifie que, dans une population de 10^6 germes, la probabilité pour qu'une mutation survienne est de 1. Chaque fois qu'une nouvelle population de 10^6 germes apparaîtra, la probabilité de mutation sera encore de 1. Le taux de mutation ne doit pas être confondu avec la proportion de mutants rencontrés à un moment donné de la croissance. Il reste toujours identique à lui-même tandis que le nombre de mutants peut augmenter ou diminuer selon que leur croissance est avantagée ou non par rapport aux autres cellules. La détermination du taux de mutation est relativement simple chez les micro-organismes. On évalue en fonction du temps la fréquence des mutants d'un type donné pendant la phase exponentielle de croissance. On trace ensuite la courbe $M/S = f(n)$ (M nombre de mutants, S nombre de sauvages, n nombre de générations) dont la pente donne le taux de mutation *(fig. VI.6)*.

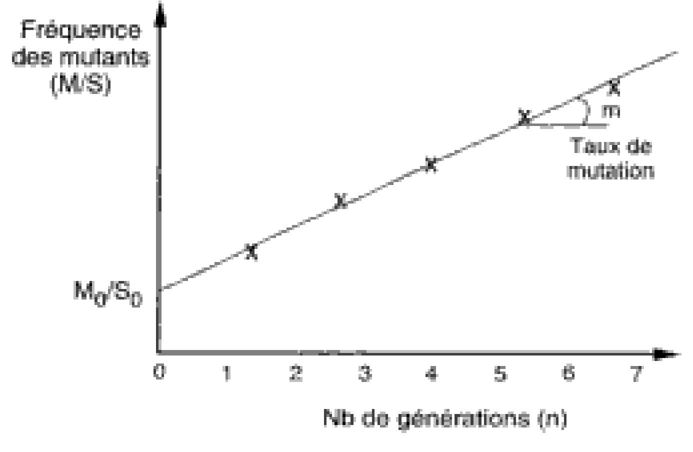


Figure VI.6 – **Détermination graphique du taux de mutation.**

Copyrighted material

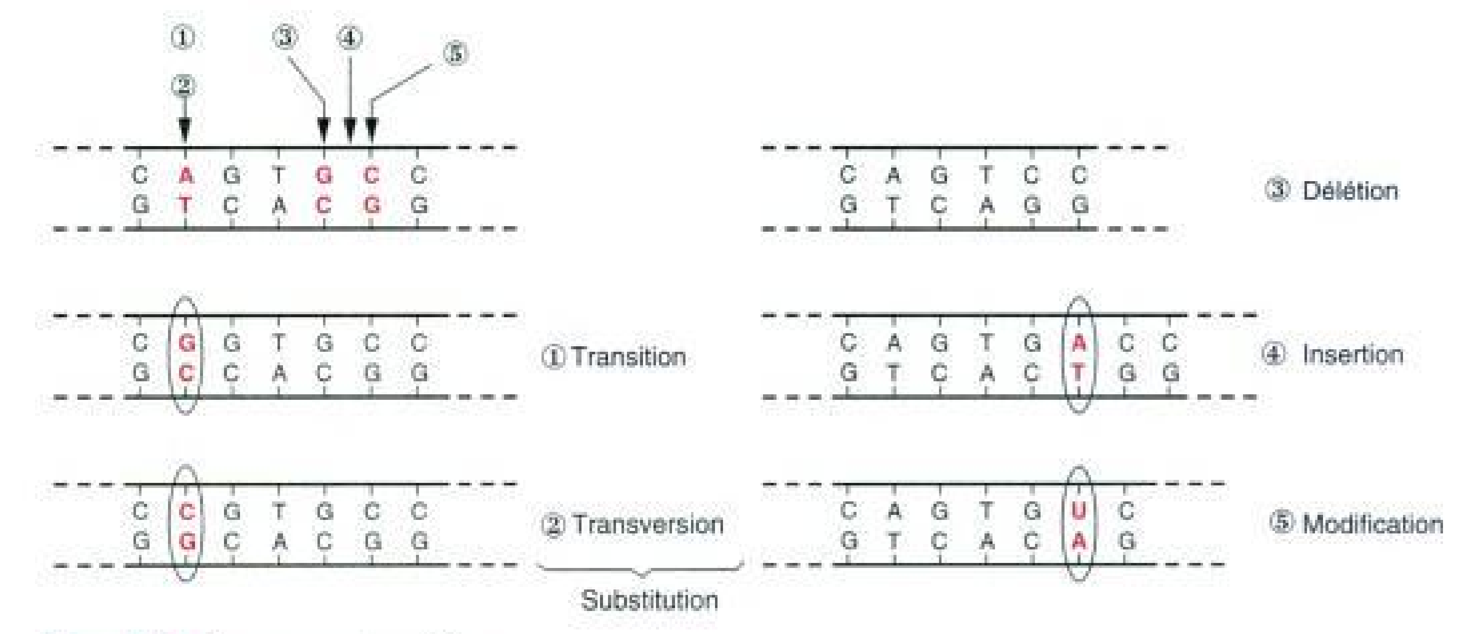


Figure VI.7 – Processus de mutation.

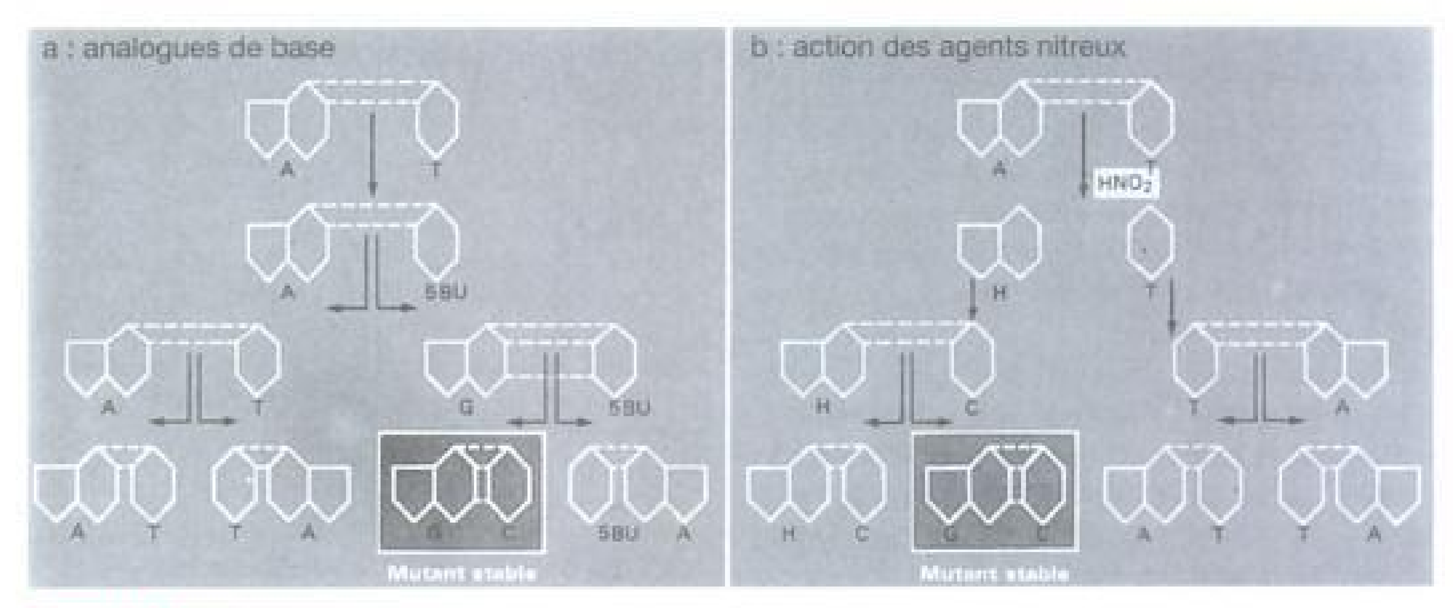


Figure VI.8 – Mutations par substitution.

A : adénine ; T : thymine ; 5 BU : bromo-uracile ; G : guanine ; C : cytosine ; H : hypoxanthine.

interviennent au cours de l'irradiation sont de plusieurs ordres : formation de dimères de bases pyrimidiques par liaison covalente entre deux bases adjacentes *(fig. VI.2)* ; hydratation de ces résidus pyrimidiques au niveau de la double liaison 4'-5' ; désamination de la cytosine ; formation de formes tautomères.

Tous les agents mutagènes n'ont pas été décrits. Certains, comme les agents alcoylants, ont une action puissante : moutardes azotées et sulfurées, oxydes d'éthylène, éthyléthane, éthylméthane-sulfonate, etc.

Certaines mutations surviennent pourtant en l'absence d'agent ou de traitement mutagène. On leur donne le nom de mutations spontanées. Beaucoup d'entre elles sont en réalité induites par des agents mutagènes endogènes provenant du métabolisme intermédiaire : analogues de purines, peroxydes, acide nitreux, etc. Les mécanismes invoqués sont donc les mêmes que les précédents : transition, transversion, insertion, délétion.

Finalement, il reste à souligner l'importance du facteur environnemental dans la genèse des mutations. C'est lui qui conditionne l'apparition des agents mutagènes. C'est lui encore qui contrôle la synthèse et les fonctions des enzymes responsables comme les enzymes de réparation.

2.3.2. Mutants morphologiques

Des altérations héréditaires dans les caractéristiques morphologiques de la bactérie ont été fréquemment observées et analysées. Elles intéres-

Copyrighted material

sent aussi bien les flagelles que les *fimbriae*, la spore, la paroi, les dimensions de la cellule, etc. Les cils peuvent être modifiés dans leurs dimensions, dans leur ondulation ou, plus simplement, disparaître comme chez certains mutants de *Listeria*. De même, des souches sporogènes peuvent donner naissance à des mutants asporogènes. Pasteur avait déjà décrit ce phénomène à propos de *B. anthracis*.

Les changements les plus spectaculaires sont ceux qui affectent les colonies bactériennes et qui sont reconnus depuis que l'on sait cultiver et isoler les bactéries sur milieux solides. On peut les observer à l'œil nu ou, mieux, sous éclairage oblique. Dans la plupart des espèces bactériennes, ces modifications ont été signalées sous le nom de variations S *(smooth)*, R *(rough)*, M (muqueux) et I (intermédiaire). Les colonies S, ou lisses, sont rondes et régulières ; les colonies R ont un aspect granuleux ou plissé avec un pourtour irrégulier ; les colonies M sont arrondies et d'une consistance visqueuse parce que pourvues d'une capsule de nature habituellement polyholosidique ; les colonies I, comme leur nom l'indique, présentent un type morphologique intermédiaire entre les types S et R. Tels sont les quatre aspects principaux *(fig. VI.9)*, mais un examen attentif des colonies révèle l'existence d'un nombre de variantes beaucoup plus élevé.

Les variations S → R des bactéries, qui apparaissent spontanément sur les milieux de culture, sont mieux connues encore sous le nom de **dissociations S → R**. Elles traduisent des modifications profondes de structure. Elles correspondent, chez les bacilles à Gram négatif, à une perte progressive de la couche lipopolyholosidique. Il est extrêmement important de les reconnaître car seules les souches S peuvent être étudiées sous leurs aspects antigéniques. Elles donnent des suspensions homogènes lorsqu'on les émulsionne dans un liquide neutre comme l'eau physiologique. Les souches R, au contraire, agglutinent spontanément dans les mêmes conditions.

Les mutations S → R sont aussi en rapport avec des modifications du pouvoir pathogène des bactéries. En général, les bactéries pathogènes forment des colonies de types S ou M ; les souches sauvages de *Salmonella*, d'*E. coli* GEI, de

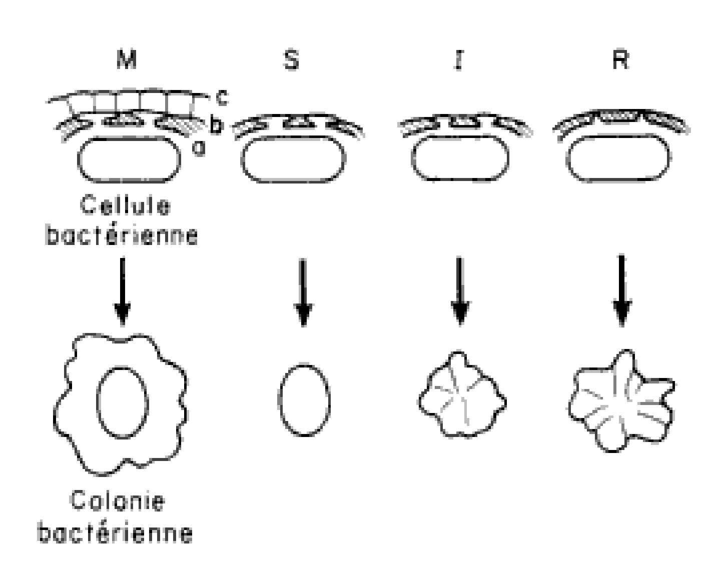


Figure VI.9 – **Les variations bactériennes.**

Les colonies peuvent être muqueuses (M), lisses (S), intermédiaires (I) et rugueuses (R). Dans les cellules bactériennes qui les composent, on notera la présence ou l'absence de la couche capsulaire (c) et la proportion plus ou moins importante des couches lipopolyosidiques (b) et lipoprotéiniques (a).

K. pneumoniae ou de pneumocoques sont de type S et sont pathogènes ; isolées sur des milieux artificiels, elles donnent naissance à des formes R dénuées de pouvoir pathogène. Il faut signaler ici que les mutations entraînant la perte de la capsule chez le pneumocoque sont dites S → R par analogie avec les entérobactéries parce qu'elles font apparaître les mêmes modifications morphologiques des colonies, sans se traduire par des altérations de structure au niveau de la paroi. Une suspension de pneumocoques capsulés S injectée par voie intrapéritonéale à la souris déclenche chez cet animal une septicémie mortelle en 48 heures ; une suspension de pneumocoques non capsulés R est totalement inoffensive.

Dans le cas du pneumocoque, la mutation qui prive la cellule de ses constituants capsulaires en inactivant une enzyme indispensable à la chaîne de biosynthèse polysaccharidique provoque d'autres changements phénotypiques : formation de colonies R, perte de virulence. De telles mutations sont appelées **pléiotropiques**.

2.3.3. Mutants nutritionnels

Ce sont des mutants chez lesquels apparaît ou disparaît un besoin nutritionnel ou qui acquièrent ou perdent un caractère biochimique (fermentation d'un sucre, dégradation d'un acide aminé, etc.).

Copyrighted mater

Les mutants **auxotrophes** forment un des groupes les plus étudiés. Les auxotrophes, rappelons-le, ont besoin d'un ou de plusieurs facteurs de croissance que n'exigent pas leurs parents, les **prototrophes** : prenons l'exemple d'une souche sauvage d'*E. coli* capable de cultiver sur un milieu synthétique minimal ; un mutant de cette souche, exigeant en leucine, ne se développera que sur un milieu en contenant.

2.3.4. Mutants résistants aux agents antimicrobiens

L'exemple le plus classique est celui de la résistance aux antibiotiques. Un antibiotique est actif sur les bactéries (voir chap. V) s'il peut pénétrer dans la cellule, s'il accède au site récepteur spécifique de son action et, enfin, s'il n'est pas altéré dans son parcours. C'est dire que l'apparition de la résistance peut survenir à la suite de la modification de l'un de ces facteurs : la membrane cytoplasmique peut devenir imperméable à la drogue, l'affinité entre la cible enzymatique et l'antibiotique peut être réduite ou supprimée et, surtout, la cellule peut acquérir une nouvelle activité enzymatique assurant la dégradation et l'inactivation de l'agent antibactérien. C'est ce dernier mécanisme qui est le plus fréquent puisque, comme cela a été exposé, les bactéries peuvent élaborer des pénicillinases qui inactivent les pénicillines, des céphalosporinases vis-à-vis des céphalosporines, des adénylases, des phosphorylases ou des acétylases contre les aminosides, etc.

Chez les cellules eucaryotes, les transferts génétiques sont des événements communs au cours de la reproduction sexuée. À partir de deux cellules sexuelles haploïdes (gamètes), on obtient par fusion une cellule diploïde appelée **zygote**.

Chez les bactéries, qui se multiplient par division binaire, ces phénomènes, beaucoup plus rares, peuvent s'observer dans des circonstances différentes ; ils ne sont pas nécessairement suivis de recombinaison. Au cours de ce processus, une partie ou la totalité d'un réplicon d'une bactérie A est transmise à une bactérie B. Le génome de la bactérie réceptrice B est appelé **endogénote** tandis que celui, généralement partiel, de la bactérie donatrice reçoit le nom d'**exogénote**. La nature et la taille de l'exogénote diffèrent selon les cas de même que le mode d'introduction. Dans la **transformation**, un fragment de matériel chromosomique (simple chaîne), extrait d'une bactérie donatrice, est introduit dans une bactérie réceptrice puis intégré à son propre chromosome. Dans la **transduction**, le fragment chromosomique (double chaîne) de la bactérie donatrice est transféré dans la bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage. Dans la **conjugaison**, l'exogénote du donneur, qui peut être plasmidique ou chromosomique, est transféré à la cellule réceptrice à la suite d'un contact direct entre les deux cellules.

Quelles que soient les modalités du processus de transfert, il aboutit dans tous les cas à la pénétration de l'exogénote dans la cellule réceptrice. Dès lors, les événements qui vont suivre peuvent être multiples.

• Il n'y a pas de recombinaison de l'exogénote dans la cellule réceptrice :

– l'exogénote, purement plasmidique, se réplique de façon autonome dans la cellule réceptrice. C'est le cas de la **conjugaison** $\mathbf{F^+ \times F^-}$;

– l'exogénote, chromosomique et plasmidique, se réplique également de façon autonome. Le zygote donne naissance à un clone de cellules partiellement diploïdes. Cela peut être observé au cours de la conjugaison et de la transduction (si le phage transducteur est assimilé à un plasmide) ;

– l'exogénote, plasmidique ou chromosomique, ne se réplique pas ; il est dilué dans le clone des cellules qui proviennent du zygote ; une seule cellule de la population sera, à un moment donné, partiellement diploïde. Ce phénomène est appelé **transduction abortive** ;

– l'exogénote peut être dégradé par voie enzymatique dans la bactérie réceptrice. C'est le phénomène de **restriction** de l'hôte.

• Il y a recombinaison, par **appariement** et **intégration**, de l'exogénote à l'endogénote chromosomique.

On admet généralement que le processus de recombinaison s'effectue après cassure puis soudure de la chaîne ou des chaînes d'ADN (**cassure-réunion**). Il faut aussi postuler que cette cassure doit se faire au même niveau des deux molécules d'ADN parental, assurant ainsi la conservation intégrale de la séquence des bases. Deux cas modè-

Copyrighted material

Tableau VI.1 – Principales endonucléases de restriction.

Enzyme	Organisme producteur	Séquence reconnue	Coupure
Eco RI	*Escherichia coli*	GAATTC	Bouts cohésifs
Bam HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	GGATCC	Bouts cohésifs
Bgl/II	*Bacillus globigii*	AGATCT	Bouts cohésifs
Pvu I	*Proteus vulgaris*	CGATCG	Bouts cohésifs
Pvu II	*Proteus vulgaris*	CAGCTG	Bouts francs
Hind III	*Haemophilus influenzae* R_d	AAGCTT	Bouts cohésifs
Hinf I	*Haemophilus influenzae* R_f	GANTC	Bouts cohésifs
Sau 3A	*Staphylococcus aureus*	GATC	Bouts cohésifs
Alu I	*Arthrobacter luteus*	AGCT	Bouts francs
Taq I	*Thermus aquaticus*	TCGA	Bouts cohésifs
Hae III	*Haemophilus aegyptius*	GGCC	Bouts francs
Not I	*Nocardia otitidiscaviarum*	GCGGCCGC	Bouts cohésifs

Le phénomène de restriction-modification n'est pas limité seulement à l'ADN phagique. Ainsi, L'ADN d'un *E. coli* transféré d'une cellule mâle à une cellule femelle au cours de la conjugaison est immédiatement dégradé lorsque la cellule réceptrice possède un système de restriction différent de celui de la cellule donneuse. Il s'agit donc d'un phénomène général de protection qui permet à certains groupes de bactéries, à l'intérieur même d'une espèce, d'échanger leur information génétique sans qu'elles soient pour autant capables d'incorporer des éléments génétiques étrangers provenant d'autres bactéries.

3.2. Transformation

3.2.1. Phénomène

Découvert par Griffith en 1928 (voir chap. II, § 2.5.5), le phénomène de transformation n'a été compris qu'en 1944 à la suite des expériences d'Avery, MacLeod et MacCarthy.

L'expérimentation de Griffith pourrait être schématisée de la façon suivante *(fig. VI.11)* :

– pneumocoques S_1 vivants → septicémie mortelle ;

– pneumocoques S_1 tués → survie ;

– pneumocoques R_3 vivants → survie ;

– pneumocoques S_1 tués + R_3 vivants → septicémie mortelle.

Le dernier résultat, pour le moins inattendu, mettait deux faits en évidence : la transformation des bactéries R vivantes non capsulées en bactéries capsulées et pathogènes et la spécificité du phénomène, puisque les bactéries virulentes qui apparaissent sont uniquement de type S_1. Griffith imagina que la transformation était due à l'action des substances polyholosidiques capsulaires, ce qui se révéla, par la suite, totalement faux.

Il fallut attendre 1944 pour qu'Avery et ses collaborateurs démontrent, après une analyse systématique *in vitro*, que la substance responsable de la transformation n'est autre que l'acide désoxyribonucléique : dans l'expérience précédente, c'est l'ADN des bactéries S_1 tuées qui est responsable, chez les bactéries R_3 vivantes, de la synthèse d'une capsule de type S_1.

Les études ultérieures ont montré que la transformation dépend, d'une part, des bactéries ainsi que de leur aptitude à être réceptrices et, d'autre part, de l'ADN transformant et de ses propriétés.

3.2.2. Bactéries compétentes

L'aptitude à la transformation a été reconnue chez d'autres espèces que le pneumocoque. Les plus étudiées, depuis 1944, sont les *Haemophilus*, les *Neisseria*, les *Streptococcus*, les *Bacillus*. Cet **état de compétence** qui apparaît, transitoirement durant 15 à 30 minutes, à la fin de la phase exponentielle de croissance semble dépendre de la production d'une substance ou d'un facteur de compétence. Celui-ci a été isolé dans le cas du pneumocoque : il s'agirait d'une protéine thermolabile de faible masse molaire (environ 10 kd), capable de conférer la compétence à d'autres cellules.

Copyrighted material

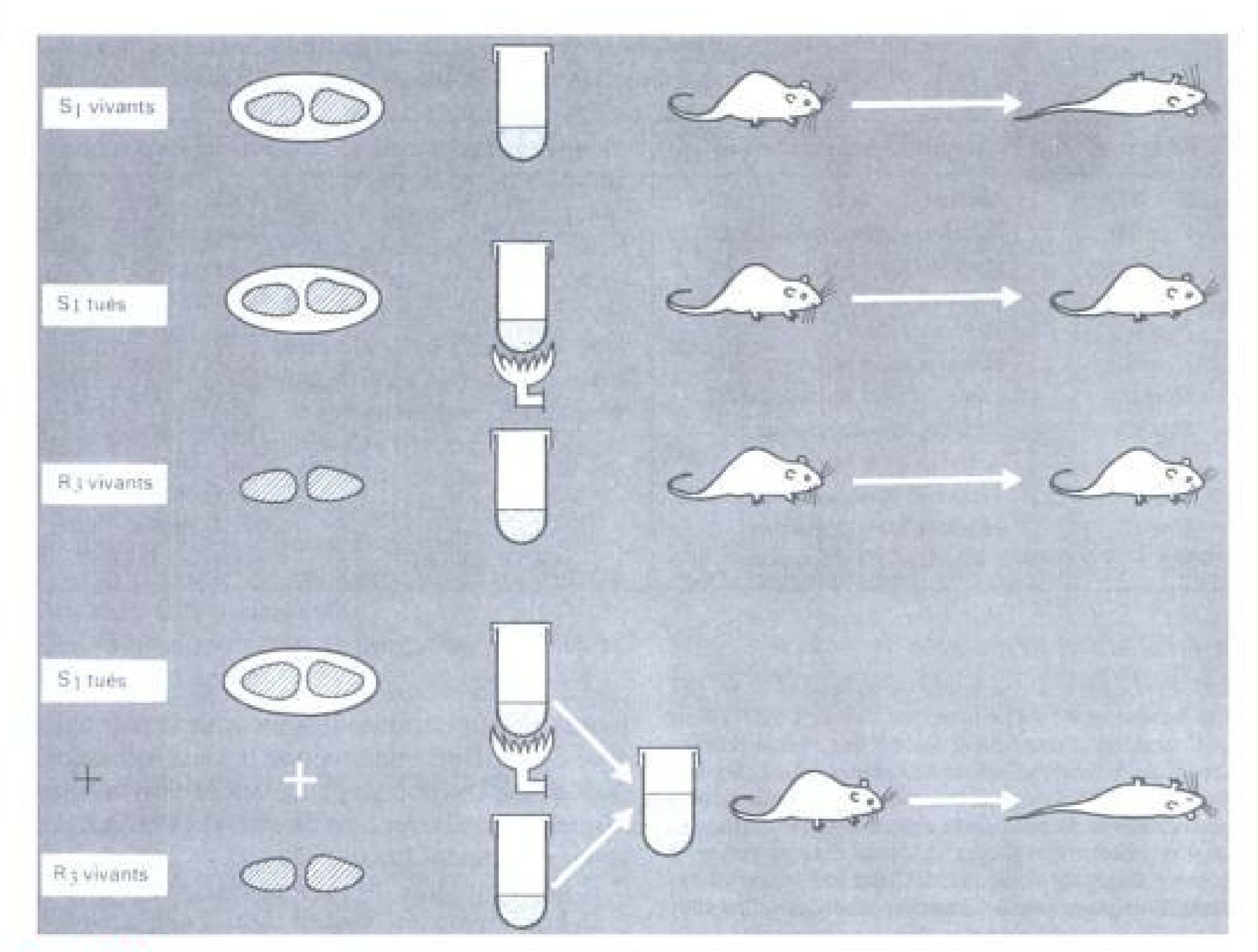


Figure VI.11 – **Expérience de Griffith.**

– les pneumocoques S_1 vivants sont virulents et tuent la souris ;
– les pneumocoques S_1 tués perdent leur pouvoir pathogène ;
– les pneumocoques R_3 non capsulés sont dénués de pouvoir pathogène ;
– un mélange de pneumocoques S_1 tués et R_3 vivants tue la souris.
Conclusion : les cultures de pneumocoques de type S_1 contiennent un principe transformant qui modifie les bactéries R_3 en les rendant S_1.

3.2.3. ADN transformant

L'aptitude à la transformation est étroitement conditionnée par la **taille** des fragments de chromosome de la bactérie donatrice. Avec le pneumocoque, la masse molaire moyenne des préparations d'ADN actif est de 5×10^6 daltons. Chaque molécule de préparation transformante représente environ la 300ᵉ partie du génome d'une bactérie. La probabilité de transformation doit donc augmenter en fonction de la **concentration en ADN**. L'ADN doit être **bicaténaire**. En général, un seul caractère est transféré au cours du phénomène, même si les bactéries donatrices et réceptrices diffèrent par de nombreuses autres propriétés.

3.2.4. Cinétique de la transformation

Lorsque les conditions les plus favorables sont remplies, c'est-à-dire avec un ADN transformant et des bactéries compétentes, le transfert peut avoir lieu. Il comprend plusieurs phases *(fig. VI.12)*.

• **Fixation**. La rencontre des fragments d'ADN avec les cellules se fait au hasard. Les bactéries compétentes sont munies, à leur surface, de sites d'adsorption pour cet ADN. Ceux-ci sont démasqués par l'action d'une protéine *(competence activator protein)* de 5 à 10 kd.

• **Pénétration**. Elle a été mise en évidence par marquage de l'ADN transformant avec du phos-

Copyrighted material

Les deux souches auxotrophes ont les caractères suivants :

– souche A : Thr^+ Leu^+ B_1^+ Phe^- Bio^- ;
– souche B : Thr^- Leu^- B_1^- Phe^+ Bio^+.

Pour reprendre l'expérience originelle des auteurs, on étale 10^9 bactéries A ou 10^9 bactéries B sur un milieu minimum ne contenant aucun des facteurs de croissance indispensables. Après le temps d'incubation habituel, aucune colonie n'apparaît. Ce résultat est logique : les bactéries A qui ont besoin de phénylalanine et de biotine pour leur croissance ne peuvent se multiplier sur un milieu synthétique ne contenant pas ces deux facteurs ; il en est de même pour les bactéries B qui exigent la thréonine, la leucine et la vitamine B_1. En revanche, si on étale un mélange de 10^8 bactéries A et B, une centaine de colonies deviennent visibles *(fig. VI.13)*. Ces colonies sont Thr^+ Leu^+ B_1^+ Phe^+ Bio^+ comme la souche prototrophe : ce sont des **recombinants**.

La possibilité d'apparition de mutants doit être ici exclue car si elle survenait avec une fréquence de 10^{-7} par exemple pour un caractère, la mutation double ou triple apparaîtrait avec une fréquence respective de 10^{-14} ou 10^{-21}, ce qui ne correspond pas au résultat observé. Les colonies apparues proviennent donc bien de recombinants, c'est-à-dire de bactéries réceptrices qui ont acquis un ou plusieurs caractères nouveaux appartenant à une bactérie donatrice. Dans l'exemple rapporté, certaines bactéries de type A ont reçu des bactéries B, ou vice-versa, les aptitudes qui leur faisaient défaut.

3.3.2. Différenciation sexuelle

Hayes, en 1952, montre que les souches parentales A et B utilisées par Lederberg n'ont pas le même comportement au cours du croisement. Elles ne jouent pas le même rôle, d'où la notion d'une différenciation sexuelle. Pour le prouver, Hayes prépare puis accouple des souches A et B sensibles ou résistantes à la streptomycine. Il constate alors que la streptomycine stérilise le croisement $A^r \times B^s$ (r = résistant ; s = sensible), mais n'a aucune action sur le croisement $A^s \times B^r$ *(fig. VI.14)* dont les descendants sont devenus prototrophes pour les 5 facteurs considérés.

Pour comprendre et interpréter le phénomène, il faut admettre l'existence d'une différenciation sexuelle entre les souches A et B :

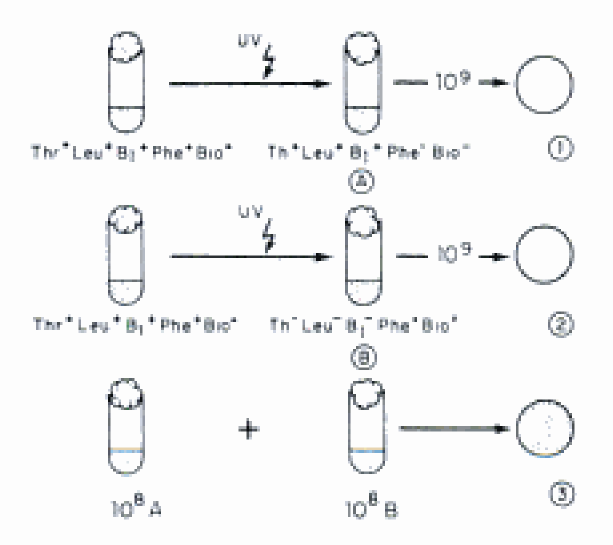


Figure VI.13 – **Expérience de conjugaison.**
(Selon Ledeberg et Tatum, 1946).

1 et 2. À partir de la souche prototrophe E. *coli* K 12 Thr^+ Leu^+ $B1^+$ Phe^+ Bio^+, on prépare des mutants polyauxotrophes A : Thr^+ Leu^+ $B1^+$ Phe^- Bio^- et B : Thr^- Leu^- $B1^-$ Phe^- Bio^+. 10^9 cellules de chacun de ces types, étalées sur un milieu minimum, ne redonnent aucune colonie de mutant prototrophe.
3. Les souches A et B mélangées, à raison de 10^8 pour chacun des types, donnent naissance à des bactéries prototrophes, qui résultent de la recombinaison des bactéries A et B.

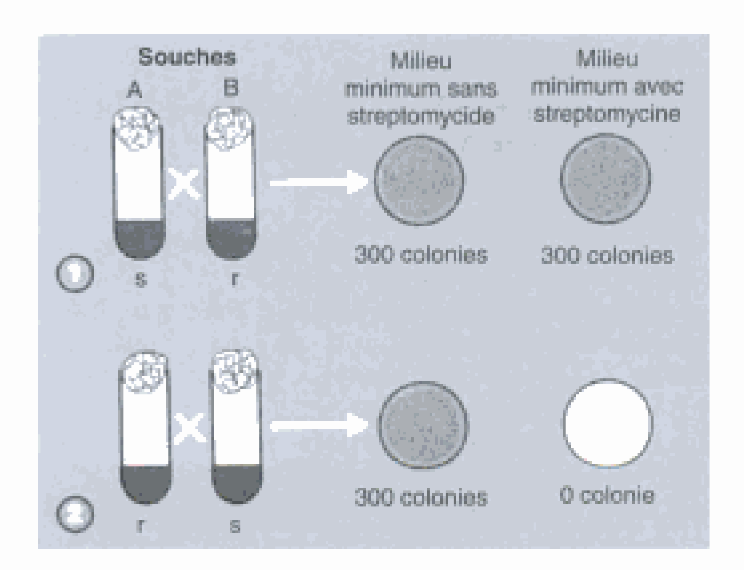


Figure VI.14 – **Expérience de Hayes montrant l'existence d'une différenciation sexuelle entre les souches A et B (s = sensible à la streptomycine ; r = résistance).**

1. Les bactéries A, même détruites par la streptomycine donnent naissance à des recombinants. Elles donnent leurs gènes et sont appelées F^+.
2. Les bactéries B, lorsqu'elles sont détruites par la streptomycine, empêchent le croisement. Elles se comportent comme des femelles dites F^-.

Copyrighted material

– les bactéries A sont donatrice de gènes. Elles se comportent comme des mâles. Leur fonction est essentielle mais non prédominante puisqu'elles peuvent transférer les gènes Thr^+ Leu^+ B_1^+ même lorsqu'elles sont tuées par la streptomycine. Elles contiennent un agent infectieux, analogue à un virus, qui convertit les femelles en mâles. Cet agent est appelé facteur sexuel, ou **facteur F** (F = fertilité), et les bactéries qui le possèdent sont dites F^+ ;

– les bactéries B sont réceptrices de gènes. Elles jouent le rôle de femelles et doivent survivre au cours du croisement. C'est pourquoi l'accouplement $A^r \times B^s$ ne donne naissance à aucun recombinant. La contribution des bactéries B est plus importante que celle des bactéries A. On les appelle F^- parce qu'elles ne possèdent pas le facteur de fertilité F.

Au cours d'un croisement $F^+ \times F^-$, la fréquence des recombinaisons chromosomiques est approximativement de 10^{-4}. Dans une population de F^+, des clones mutants ont été isolés, capables d'un transfert chromosomique avec une fréquence 1 000 fois plus grande. Ces mutants sont appelés Hfr, c'est-à-dire **haute fréquence de recombinaison**.

• **Nature**. Le facteur F d'*E. coli* K_{12} présente une structure circulaire dont la longueur est d'environ 2 % de celle du chromosome bactérien. Il contient approximativement 10^5 paires de bases.

• **Réplication**. Le facteur F est une unité autonome et indépendante de réplication, ou réplicon, qui présente, à l'image du chromosome bactérien, 3 ou 4 copies chez les bactéries en phase de croissance exponentielle. Chez les mutants Hfr, le facteur F n'est plus autonome mais intégré au génome bactérien ; c'est un **épisome**.

• **Antigènes F**. La présence du facteur F détermine la formation dans la cellule de récepteurs de surface, vraisemblablement de nature polysaccharidique, pouvant jouer un rôle au cours de l'accouplement. Elle entraîne surtout la synthèse spécifique de *pili* appelés *pili* F ou *pili* sexuels.

Il était séduisant de penser que les *pili* F, avec leur structure cylindrique creuse, pouvaient être les organes de copulation à travers lesquels les mâles injectaient leur ADN dans la cellule femelle. Cette hypothèse n'a jamais été vérifiée dans les faits et l'on admet qu'ils sont plutôt des « câbles d'amarrage » permettant l'accouplement. Ce n'est que par la suite qu'un véritable pont cytoplasmique serait constitué en vue du transfert.

3.3.3. Analyse du transfert

Grâce aux mâles Hfr, le phénomène de conjugaison a pu être analysé dans ses mécanismes profonds. Au cours des croisements Hfr × F^-, il est apparu que les recombinants ne recevaient qu'une fraction du matériel génétique du donneur.

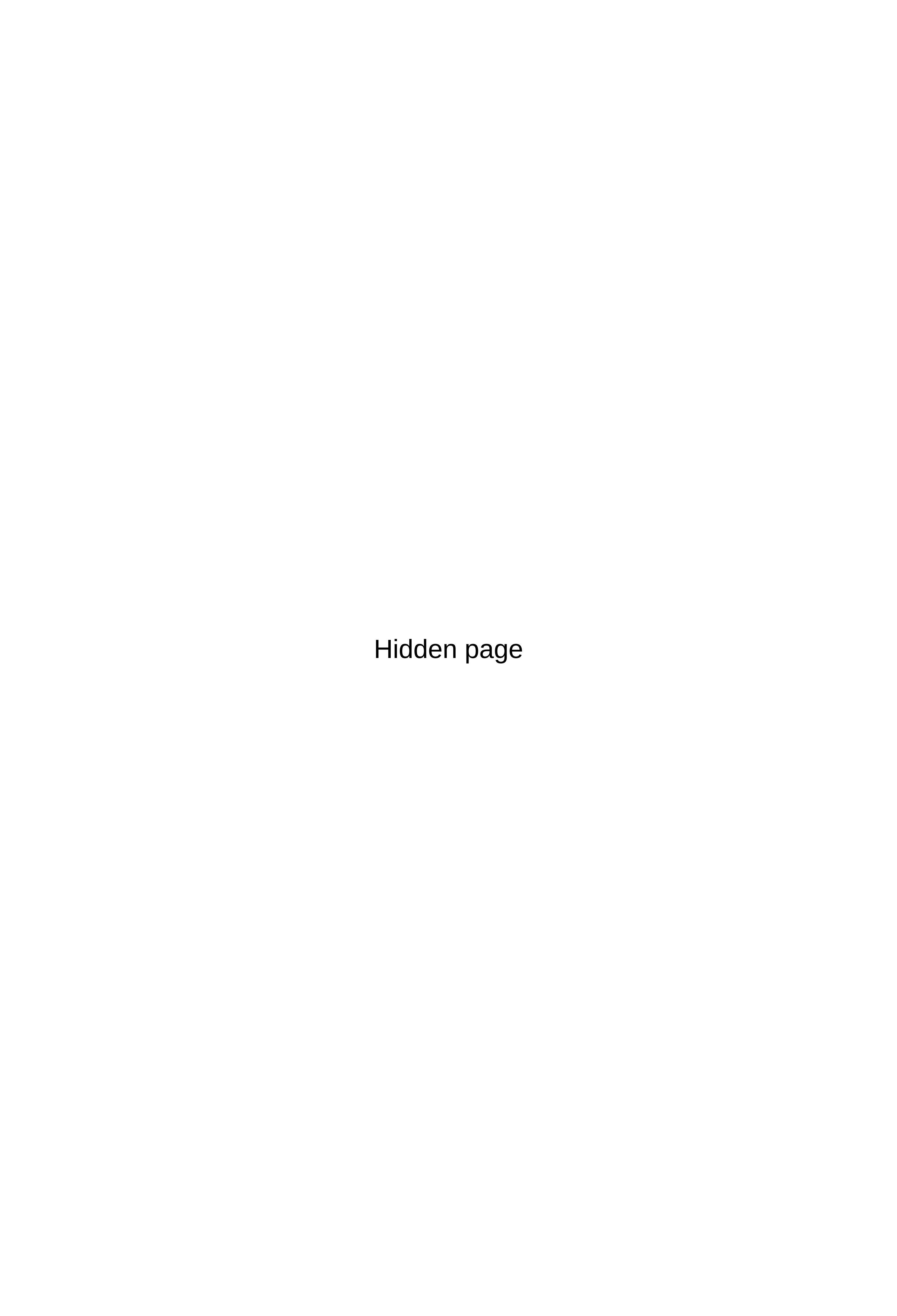
Les expériences de conjugaison interrompue de Wollman et Jacob ont été déterminantes pour connaître le mécanisme du transfert. Elles consistent, à partir d'un mélange de bactéries Hfr^+ et F^- en voie d'accouplement, à prélever des échantillons et à les soumettre à une agitation courte mais violente. Ce traitement est destiné à interrompre l'accouplement sans nuire à la viabilité des cellules parentales ou recombinantes. Pendant toute la durée de la conjugaison (environ 1 heure), les échantillons, prélevés à intervalles réguliers de 5 minutes, sont étalés sur des milieux sélectifs différents, permettant ainsi de dénombrer les différents types de recombinants. Soit le croisement Hfr (A^+ B^+ C^+ D^+ E^+) × F^- (A^- B^- C^- D^- E^-). Les caractères A^+, B^+, etc. peuvent être recherchés en étalant les cellules recombinantes sur des milieux sélectifs. La fréquence d'apparition de ces marqueurs sélectionnés peut être calculée. Plus le temps de contact entre les mâles et les femelles est long avant l'arrêt de conjugaison, plus le nombre de marqueurs transférés peut être élevé. Avec un temps de 5 minutes, aucun marqueur n'est transmis. Si l'accouplement dure 10 minutes, seul le caractère A est transféré ; s'il se poursuit pendant 15 minutes, A et B le sont ; au bout de 20 minutes, le passage des gènes A, B et C est acquis, etc. L'interprétation la plus logique est que les gènes du mâle pénètrent dans la bactérie femelle dans l'ordre dans lequel ils sont inscrits sur le chromosome et à une vitesse proportionnelle à leurs distances respectives les uns des autres. Le transfert commence en un point donné du chromosome (origine) et s'effectue ensuite régulièrement, il est donc **orienté** et **progressif.** Si la conjugaison n'est pas interrompue, le chromosome entier sera transmis en 90 minutes à 37 °C. Cette éventualité est pourtant rare en raison des séparations spontanées des couples. Il en résulte que plus un caractère est éloigné du point d'origine, moins il a de chance d'être transmis *(fig. VI.15)*.

Le transfert du chromosome grâce à une bactérie Hfr est un phénomène beaucoup plus rare que le transfert de plasmides de conjugaison par une bactérie F^+. Le principe du transfert est le même mais, compte tenu de la petite taille des plasmides, leur transfert sera plus facile et plus fréquent (voir chap. II) ; de plus, le plasmide une fois transféré n'a pas besoin d'être intégré dans l'endogénote mais va rester autonome.

3.3.4. Analyse génétique par conjugaison

L'un des grands avantages du phénomène de conjugaison est de permettre d'étudier le **groupe de liaison** *(linkage)* entre les gènes, c'est-à-dire leur tendance à rester ensemble au cours de la recombinaison, et, finalement, de dresser la carte génétique des cellules. On peut y parvenir par une double voie au cours de croisements non interrompus ou dans les expériences de conjugaison interrompue.

Copyrighted material



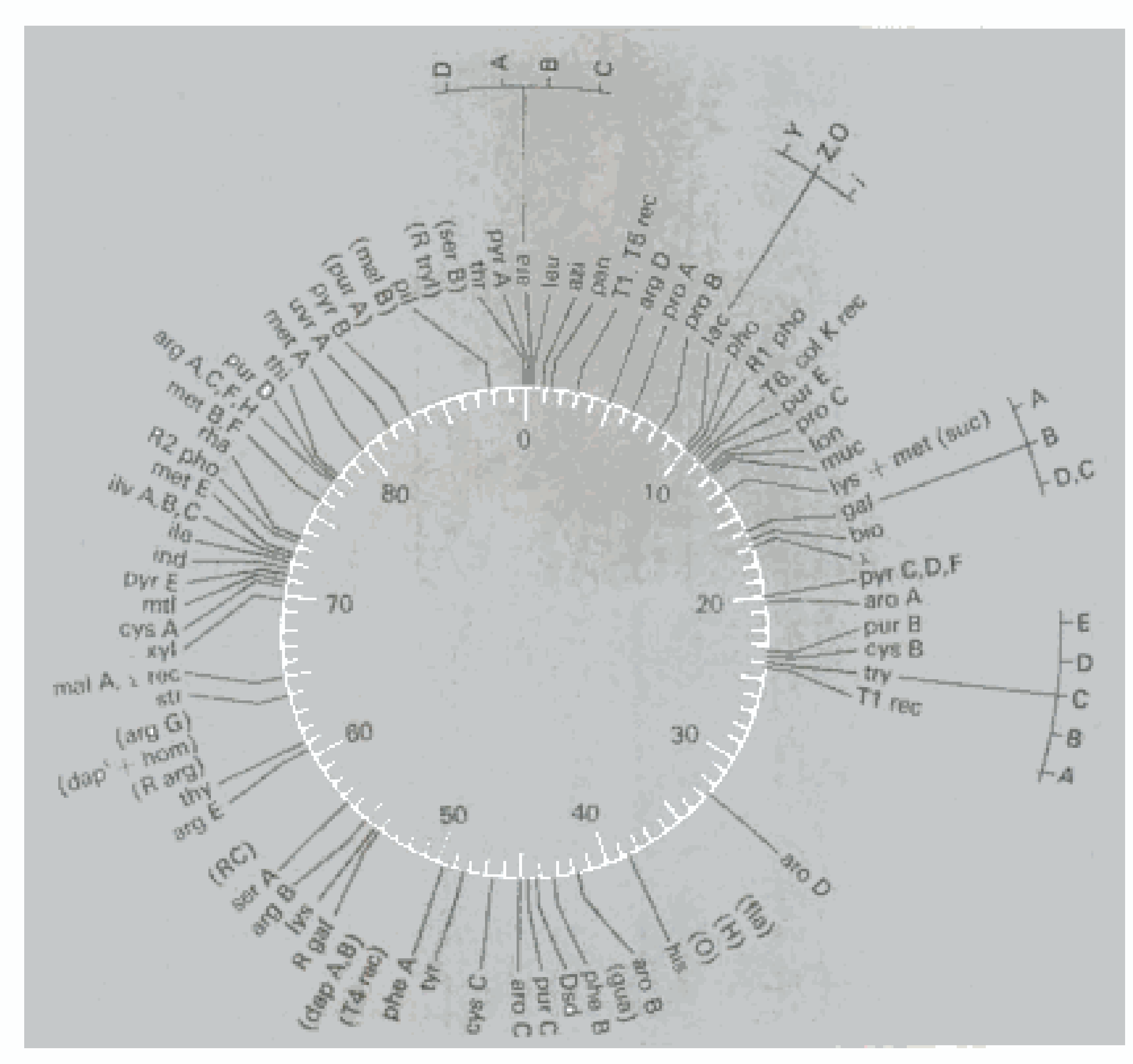


Figure VI.16 – Carte génétique d'*E. Coli*.
(D'après Taylor et Thoman).

3.4. Transduction et conversion

C'est un transfert génétique au cours duquel un ou plusieurs gènes sont transmis d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage dit **transducteur**. Ces gènes sont portés par le bactériophage à la suite de sa multiplication dans la bactérie donatrice génétiquement différente de la bactérie réceptrice.

3.4.1. Découverte du phénomène

Le phénomène a été mis en évidence en 1951 par Zinder et Lederberg chez *S. typhi murium*. Ces auteurs cherchaient à recombiner des mutants auxotrophes provenant de diverses souches de *Salmonella* afin d'obtenir des prototrophes. C'est un autre phénomène qu'ils découvrirent, différent de la conjugaison.

Deux souches auxotrophes de *Salmonella* sont utilisées *(fig. VI.17)* : l'une (2A) exige de l'histidine pour sa croissance, l'autre (22A) du tryptophane. Dans un tube en U séparé à la base par une membrane de verre fritté interdisant le passage des bactéries mais non celui des virus, on introduit d'un côté 10^8 bactéries de la souche 2A et, de l'autre, 10^8 de la souche 22A. Des prototrophes sont formés de ce dernier côté à une fréquence de 10^{-5} environ, mais aucun ne peut être isolé de la partie ensemencée avec la souche 2A.

Les bactéries 22A portent un bactériophage (P22) qui traverse la membrane et lyse les cellules 2A : un nouvel agent filtrable (FA) est libéré. Quelques cellules de la souche 22A, à son contact, acquièrent de nouvelles propriétés ; elles deviennent capables de cultiver sans tryptophane. Cet agent filtrable n'est pas détruit par la désoxyribonucléase. Sa taille, sa constance de sédimen-

Copyrighted material

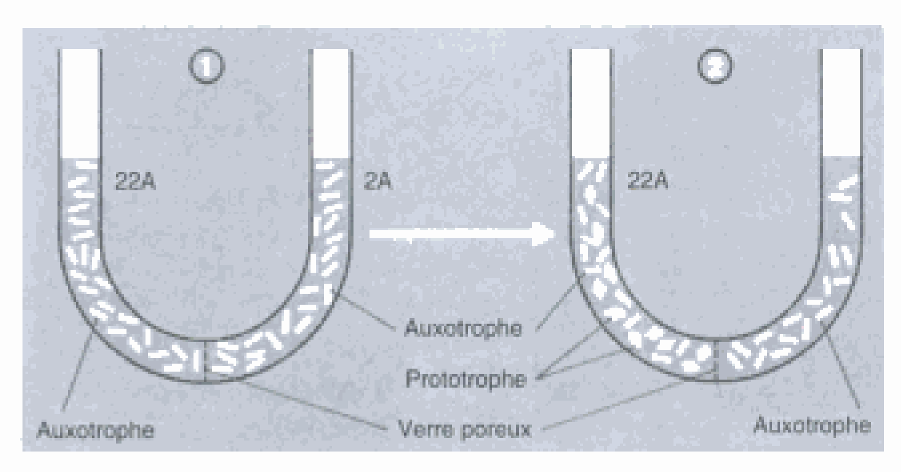


Figure VI.17 – **Expérience de Zinder et Lederberg.**

1. Dans un tube en U séparé par un disque de verre fritté sont disposées 10^8 bactéries 22 A (tryptophane⁻) d'un côté, 10^8 bactéries 2 A (histidine⁻) de l'autre.
2. Du côté des bactéries 22 A on récupère des prototrophes à une fréquence de 10^{-5} environ.

tation, sa sensibilité à la chaleur et son inactivation par un sérum antiphage sont autant de caractères identiques à ceux du bactériophage P22. Ce transfert génétique réalisé par l'intermédiaire d'un bactériophage a reçu le nom de **transduction**.

3.4.2. Différents types de transductions

Dans la transduction comme dans les autres transferts génétiques, un petit fragment seulement du chromosome du donneur est transféré à la cellule réceptrice. Dans le système précédent (phage P22-*Salmonella*), n'importe quelle région du chromosome du donneur peut être transduite. C'est la **transduction généralisée et non spécifique**. Dans d'autres cas, l'exogénote n'est pas intégré dans la bactérie réceptrice. Il est dilué au cours des divisions. Ce mode de transduction est appelé **abortif**. Avec d'autres bactériophages enfin, la transduction est **restreinte et spécifique** parce qu'un groupe de gènes seulement, situé au voisinage du point d'attachement du prophage, peut être transduit.

3.4.2.1. Transduction généralisée (fig. VI.18)

Elle correspond au phénomène découvert par Zinder et Lederberg et qui vient d'être décrit. Les bactériophages qui induisent les transductions généralisées possèdent une nucléase qui fragmente le chromosome bactérien. L'un des morceaux d'ADN peut être incorporé au hasard dans le phage transducteur, d'où l'absence de spécificité dans le processus . Les propriétés susceptibles d'être transduites sont nombreuses : pouvoir de fermenter les sucres, résistance aux antibiotiques, synthèse d'un antigène, etc. De même, nombreux sont les genres bactériens chez lesquels le phénomène peut être reproduit : *Escherichia, Shigella, Proteus, Pseudomonas, Vibrio, Staphylococcus, Bacillus*…

Au cours de la transduction généralisée, les particules de phages transducteurs ne contiennent pas d'ADN phagique détectable. Elles apparaissent constituées d'un fragment d'ADN bactérien inclus dans une enveloppe phagique. En fait, le lysat provenant d'un phage transducteur contient deux types de particules, comme cela découle d'expériences de séparation d'ADN en gradients de densité : les unes, nombreuses, possèdent de l'ADN phagique ; les autres, rares, ne recèlent que de l'ADN de la bactérie hôte ; ces dernières sont seules transductrices.

L'activité transductrice dépend du marqueur, des bactéries donatrices et réceptrices, de leur état physiologique, de la multiplicité des phages, etc. Étant donné que l'ADN d'une particule bactériophagique est environ la 100ᵉ partie de celui d'une bactérie, le nombre de marqueurs transductibles ne peut être que faible. L'un des fragments chromosomiques le plus long à avoir été transduit est le segment Thr-Leu (thréonine-leucine).

L'une des caractéristiques les plus notoires du phénomène de transduction est son indépendance des phénomènes de lysogénie et de lyse avec les-

Copyrighted material

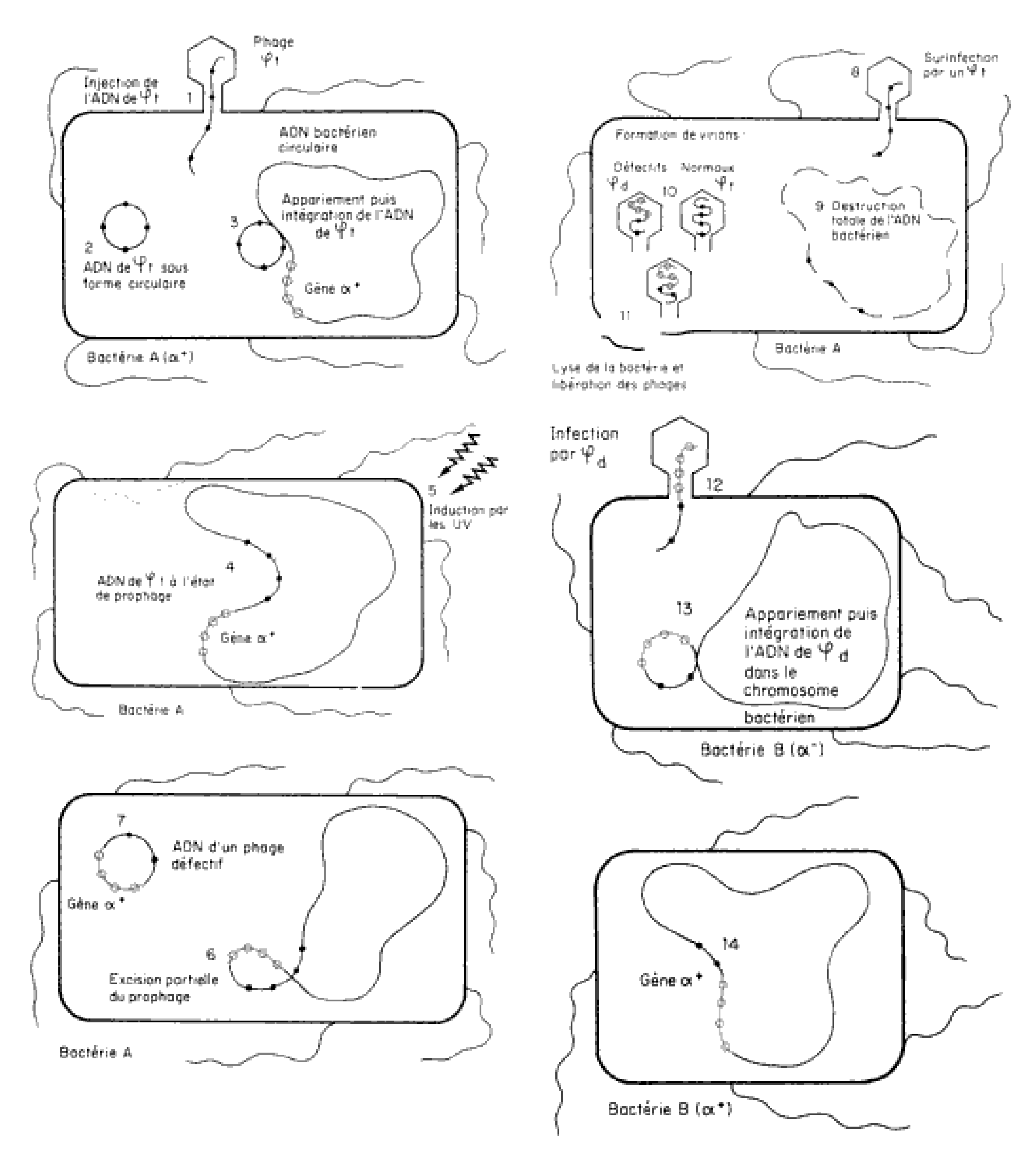


Figure VI.19 – **Transduction restreinte.**

φ_t : phage tempéré ; φ_d : phage défectif ;
A : bactérie donatrice ; B : bactérie réceptrice ;
α : gène transmis (la bactérie A possède ce gène à l'état fonctionnel, la bactérie B est α^-).
Après l'infection par φ_t (1), l'ADN phagique se met sous forme circulaire (2), puis s'apparie avec une région homologue très précise (adjacente au gène a dans cet exemple) du chromosome (3), et s'intègre à l'état de prophage (4). L'induction du cycle lytique par les UV (5) entraîne la libération de l'ADN phagique ; si l'excision ne se fait pas au bon endroit (6), le gène a est entraîné : l'ADN du phage est défectif, il reste à l'état circulaire (7) mais ne peut induire de cycle lytique. La surinfection (8) par un nouveau φ_t va déclencher le cycle lytique (9) avec formation de virions normaux et défectifs (10). Après libération (11), un phage défectif peut infecter une bactérie B (qui est α^- par exemple). L'ADN de φ_d s'intègre dans le chromosome de B (13). La bactérie B possède un nouveau caractère : α^+.

Copyrighted material

phages normaux et des **phages transducteurs**, porteurs du caractère Gal, à une fréquence 10^{-6}. Ces phages transducteurs incomplets, puisqu'il leur manque une partie de leur ADN, sont **défectifs**. Ils perdent, en effet, une ou plusieurs de leurs propriétés. On les appelle λdg (λ, défectifs, porteurs du gène gal).

3.4.2.3. Transduction abortive

Dans la **transduction abortive**, le fragment d'ADN injecté dans la cellule réceptrice n'est pas intégré dans le génome bactérien. Il n'est pas non plus répliqué de façon autonome, mais il est fonctionnel et s'exprime normalement. Au cours de la division, une cellule seulement, quel que soit le nombre de générations obtenues et observées, sera porteuse du marqueur transduit. Le fragment d'ADN est donc dilué.

3.4.3. Conversion lysogénique

Certaines propriétés bactériennes apparaissent induites par la présence de gènes phagiques. On ne les rencontre jamais, en effet, chez des souches qui n'hébergent pas de bactériophages. C'est ainsi que *C. diphteriae* synthétise une toxine lorsqu'il est lysogénisé par un prophage β-spécifique. La présence du prophage est indispensable pour le codage de la toxine diphtérique, en tant que protéine spécifique. L'information est donc à la fois bactérienne et virale. Cette particularité est aussi observée avec la toxine érythrogène des *Streptococcus* du groupe A, la fibrinolysine des *Staphylococcus* et de nombreux facteurs antigéniques O ou H des *Salmonella*. Elle a été retrouvée chez les *Shigella* et les *Pseudomonas*. Cette acquisition de propriétés nouvelles chez les bactéries infectées par un bactériophage a reçu le nom de **conversion lysogénique**.

Le phénomène de conversion lysogénique peut être comparé à celui de transduction puisque les deux font appel à l'intervention d'un bactériophage. Il y a pourtant, entre les deux, des différences fondamentales :

– dans la transduction, le phage a un rôle purement véhiculaire ; son propre génome n'intervient aucunement. Dans la conversion lysogénique, au contraire, le génome phagique joue le rôle essentiel et unique : s'il est présent, il lysogénise la bactérie et induit le nouveau caractère bactérien ; s'il est absent, la bactérie n'est plus lysogénisée et le caractère disparaît ;

– dans la transduction, la fréquence des bactéries transduites par rapport aux bactéries infectées est faible, de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-8}. Dans la conversion lysogénique, toutes les bactéries qui reçoivent le phage sont lysogénisée et converties : le nouveau caractère s'exprime dans les 8 à 10 minutes après la contamination.

4. Applications

4.1. Mutagenèse

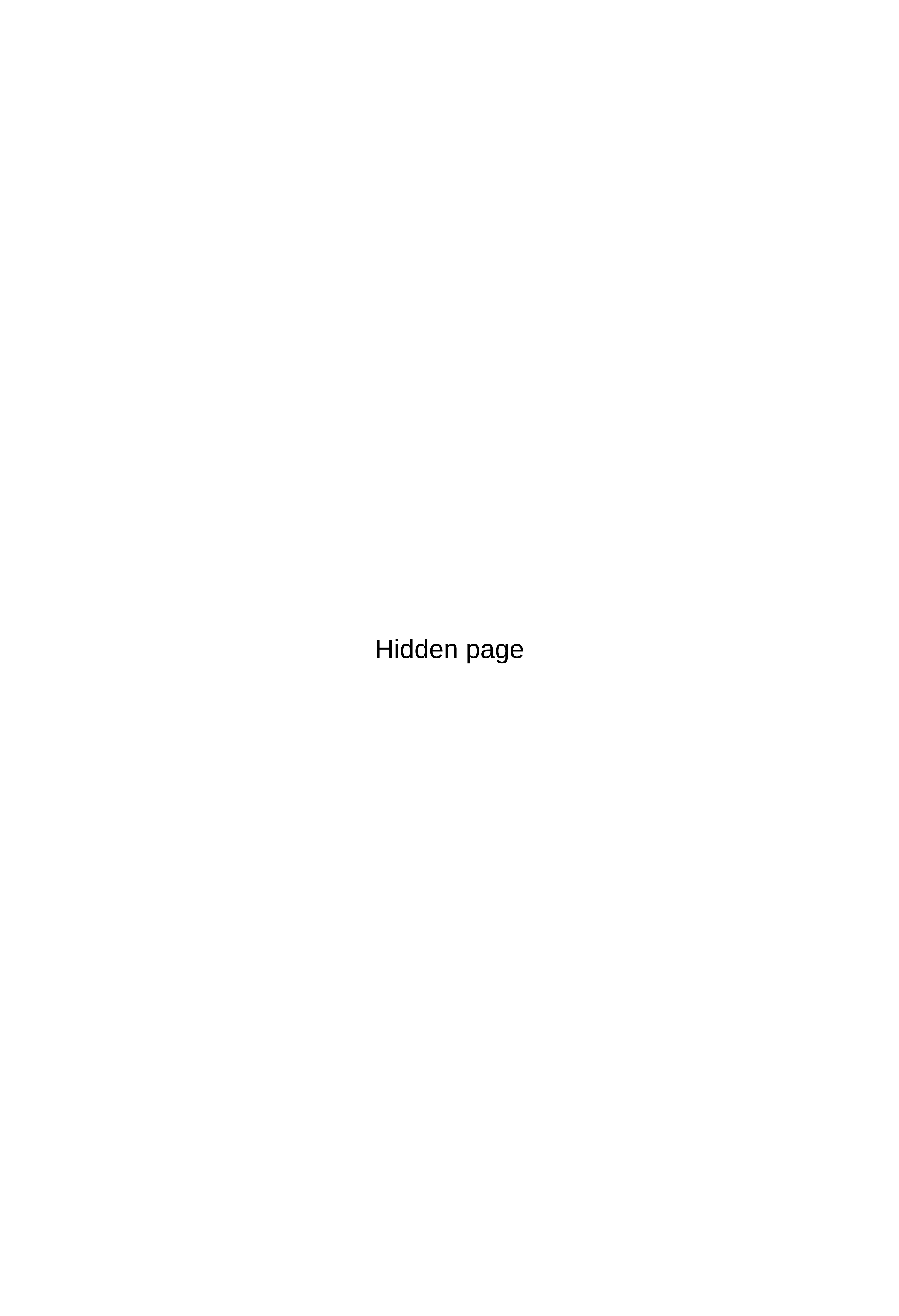
La présence dans notre environnement de nombreux agents physiques ou chimiques, sous-produits des sociétés industrialisées et potentiellement cancérogènes, est devenue une source d'inquiétude. On avance que 80 % des cancers humains résulteraient du contact (exposition – inhalation – absorption) avec ces substances. Chaque année, environ 1 000 composés de synthèse nouveaux sont livrés sur le marché mondial et des milliers d'autres sont rejetés dans l'environnement sans contrôle possible.

La détection des corps cancérogènes sur l'animal est une expérimentation longue (de 2 à 3 années) et coûteuse (de l'ordre de plusieurs centaines de milliers d'euros). On comprend, dans ces conditions, la faveur que connaissent les tests de mutagenèse sur les bactéries, qui reposent sur le postulat selon lequel presque tous les agents cancérogènes seraient mutagènes. On est redevable à Bruce Ames d'avoir imaginé ce test à court terme entre les années 1971 et 1975.

4.1.1. Principe du test d'Ames

Un agent physique ou chimique est cancérogène pour l'homme quand il provoque des lésions de l'ADN cellulaire qui déclenchent un processus complexe de transformation cancéreuse. L'ADN représentant le matériel héréditaire commun à toutes les cellules vivantes, animales ou bactériennes, on peut en déduire que toute altération de celui-ci est également nocive. Tel est le point de départ qui

Copyrighted material



L'application la plus connue du génie génétique concerne la production par la bactérie d'une protéine nouvelle. À cet effet, le gène donneur (d'une cellule procaryote ou eucaryote) peut être préparé directement par synthèse chimique (petite molécule) ou indirectement à partir de l'ARNm qui en est la transcription exacte. Pour être transplanté dans la bactérie réceptrice, il est lié à un **vecteur plasmidique** auquel est couplé un système d'expression. Le **gène hybride** ainsi réalisé est amplifié en même temps que se multiplie la bactérie ; c'est le **clonage**. L'**expression** de ce gène est l'étape finale qui conduit la cellule réceptrice à fabriquer en abondance une protéine étrangère.

4.2.1. Production d'une protéine

La production d'une protéine par génie génétique repose sur cinq opérations essentielles :

– la synthèse ou l'extraction-purification, suivie de la fragmentation de l'**ADN donneur** codant pour la protéine ;

– le couplage de cet ADN étranger à un **vecteur** (plasmidique ou bactériophagique) aboutissant à un **ADN recombinant** ;

– l'introduction du couple vecteur + gène dans une **bactérie réceptrice** ;

– la sélection des **clones recombinants** ;

– la caractérisation et la purification de la protéine synthétisée.

4.2.1.1. Préparation de l'ADN donneur

Cette étape est fondamentale car le produit obtenu (protéine) est directement fonction du message génétique dont il est issu, c'est-à-dire de la séquence nucléotidique présente sur le gène. Une connaissance quasi parfaite de cette séquence est donc nécessaire afin de préparer correctement l'ADN donneur. Trois procédés peuvent être utilisés *(fig. VI.21)*.

• Lorsqu'il s'agit de produire une molécule protéique de petite taille et bien connue dans sa structure primaire, le gène peut être synthétisé par voie chimique. Cette opération a été réalisée pour la première fois en 1977 avec la somatostatine, hormone peptidique de 14 acides aminés dont le gène est formé de 42 nucléotides seulement. En accolant, dans le bon ordre, les différents nucléotides constitutifs, on « reconstruit » le gène. La même méthode a été appliquée avec succès à la synthèse du gène de l'insuline humaine (Itakura *et coll.*). Celle-ci présente cependant des limites. Il est nécessaire, d'une part, de connaître avec précision la structure primaire du produit du gène. D'autre part, la synthèse *in vitro* d'une séquence nucléotidique est impraticable pour une molécule de grande taille comprenant, par exemple, plusieurs centaines d'acides aminés ; le rendement et la pureté du polynucléotide diminuent en effet rapidement au fur et à mesure de l'allongement de la chaîne.

• L'ADN peut être extrait et purifié à partir des cellules. Après concentration par centrifugation, les cellules sont traitées de manière à détruire membrane et paroi (lysozyme en présence d'EDTA et de SDS pour les bactéries, cellulases et chitinases pour les cellules fongiques et végétales, simple détergent pour les cellules animales). Après déprotéinisation, l'ADN est extrait (phénol-chloroforme) et précipité (éthanol). Il doit être ensuite dosé (absorbance à 260 et 280 nm). La dernière étape consiste à « découper » le gène donneur en

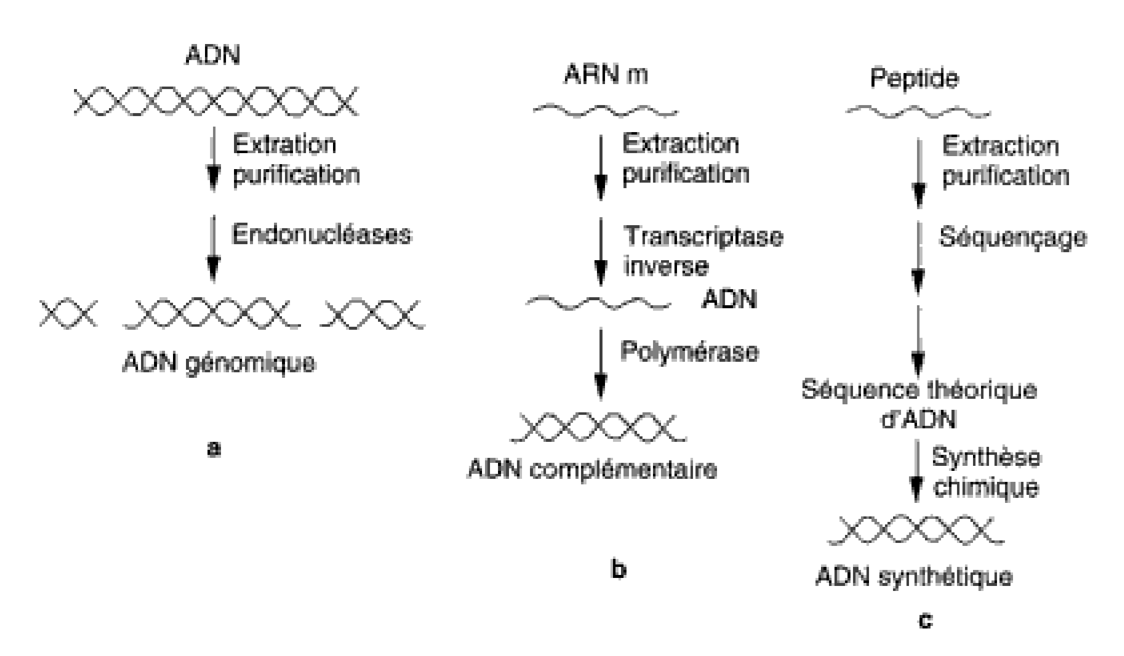


Figure VI.21 – **Méthodes de préparation de l'ADN donneur.**

a : extraction et traitement aux endonucléases ; b : ADN c ; c : synthèse chimique.

Copyrighted material

hydrolysant la molécule (traitement aux enzymes de restriction judicieusement choisies) et en séparant les fragments obtenus (électrophorèse en gel d'agarose, ultracentrifugation en gradient de CsCl).

• On peut par ailleurs, pour préparer un gène donneur, avoir recours, ce qui est le cas le plus fréquent, à une méthode indirecte. En effet, dans le cytoplasme de chaque cellule d'un organisme supérieur, figurent à tout instant des populations d'ARNm qui reflètent l'activité des gènes et qui sont caractéristiques de l'état de différenciation. Tel est le cas, par exemple, de l'ARNm qui dirige la synthèse de la globine et qui est particulièrement abondant chez les cellules précurseurs des globules rouges. C'est aussi le cas de l'ARNm qui code pour la synthèse de l'ovalbumine de poule, protéine majeure du blanc d'œuf et qui représente jusqu'à 40 % de l'ARNm cellulaire. Les méthodes physico-chimiques actuelles permettent de purifier cet ARN jusqu'à 60 %. Dans un second temps, on prépare une copie de cet ARN, sous forme d'**ADN complémentaire** (ou ADNc) grâce à une enzyme d'origine virale, la **transcriptase inverse** (appelée aussi transcriptase reverse) *(fig. VI.22)*. La conversion de l'ARNm en ADNc, décrite initialement par Rougeon en 1975, représente une opération essentielle du génie génétique.

4.2.1.2. Couplage à un vecteur

Pour introduire et amplifier un fragment d'ADN étranger dans une bactérie, on pourrait imaginer d'insérer ce fragment directement dans le chromosome bactérien. Cette greffe est, techniquement, irréalisable. Par ailleurs, le gène donneur, pour s'exprimer ultérieurement, doit contenir non seulement les régions codantes mais aussi les séquences impliquées dans la régulation. Pour cela, on a recours en général à des plasmides qui servent de vecteurs et qui permettent, dans des conditions précisées plus loin, l'expression de l'ADN étranger.

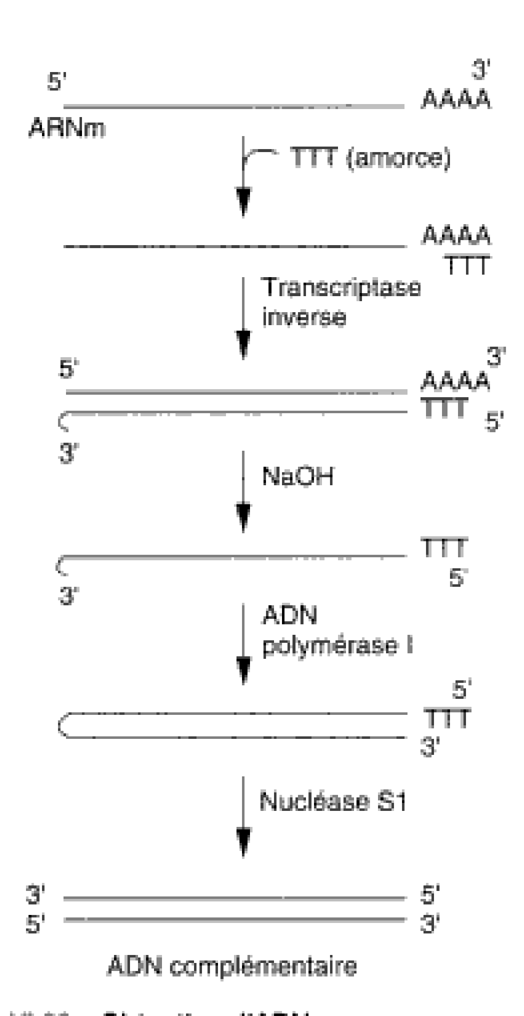


Figure VI.22 – **Obtention d'ADNc.**

De nombreux vecteurs bactériens ont été préparés à partir du plasmide Col E_1 qui code pour la colicine E_1 et qui possède la propriété intéressante de se répliquer dans la bactérie hôte pendant 12 heures, en présence d'un agent sélecteur, le chloramphénicol. Des vecteurs obtenus par recombinaison entre le plasmide Col El et des plasmides de résistance aux antibiotiques sont le plus souvent utilisés. Ces plasmides, de petite taille, rendent possible l'intégration de longs fragments d'ADN étranger ; ils sont privés de leur fonction de transfert, ce qui évite leur transmission spontanée entre bactéries ; ils sont amplifiés efficacement, comme précédemment, et sont sélectionnés par l'intermédiaire de leurs déterminants de résistance. L'intégration au vecteur (ADN receveur) de la molécule d'ADN étranger (ADN donneur) donne naissance à un ADN hybride appelé **ADN recombinant**.

Trois procédés de couplages peuvent être utilisés selon le cas.

• **La « transférase terminale »**. Cette méthode consiste, dans le cas où les extrémités du vecteur et du fragment d'ADN étranger sont « franches » (non cohésives), à prolonger un des deux brins de chacune des molécules par une séquence ploynucléotidique de façon à obtenir des extrémités cohésives *(fig. VI.23)*. Par exemple, l'ADN étranger sera prolongé par une séquence polyG et le vecteur par une séquence polyC. Un traitement par une ligase assurera la liaison des deux brins.

• **Les « endonucléases de restriction »**. Cette méthode consiste à ouvrir les molécules du vecteur et du fragment d'ADN à greffer par la même enzyme de restriction *(fig. VI.10)* de façon à obtenir des extrémités parfaitement cohésives. Comme précédemment, les brins seront ressoudés par action d'une ligase.

• **L'« ADN ligase » du bactériophage T_4**. Ce dernier procédé consiste à utiliser la propriété remarquable de cette enzyme à relier deux molécules d'ADN sans qu'il soit nécessaire de rendre leurs extrémités cohésives *(fig. VI.24)*. Cette opération doit être réalisée en présence d'ARN ligase qui joue le rôle de cofacteur.

Ainsi, dans le cas du gène artificiel (somatostatine) codant pour la protéine à synthétiser et qui correspond en fait à un gène de structure, pour l'exprimer ce gène doit être branché dans la continuité d'un système d'expression. Le mieux connu et le plus utilisé en génie génétique est celui qui contrôle l'activité du gène de la β-galactosidase au niveau de l'opéron lactose (gène de régulation i^+). Le vecteur d'expression de la somatostatine a été ainsi construit en couplant au plasmide pBR_{322} le gène de la β-galactosidase provenant de l'opéron lactose bactérien (la plus grande partie) et son système de régulation *(fig. VI.25)*. Le gène de la somatostatine

Copyrighted material

Prenons l'exemple du plasmide pBR_{322} qui porte les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. L'enzyme de restriction $BamH_1$ est utilisé pour préparer le vecteur plasmidique et l'ADN étranger. Au niveau du plasmide, la coupure a lieu dans le gène de résistance à la tétracycline. Ainsi, lors du couplage, trois possibilités peuvent s'offrir à nous :

– soit il y a recircularisation du plasmide avec ces deux gènes de résistance (**plasmide natif**) ;

– soit il y a recombinaison plasmide-ADN étranger (ce que l'on cherche, et donc le gène de résistance à la tétracycline n'existe plus du point de vue fonctionnel car l'ADN étranger y est inséré ; **plasmide recombinant**) ;

– soit il y a recircularisation de l'ADN étranger (aucun gène de résistance).

Sur le milieu de culture avec ampicilline, seules les colonies de type 1 et 2 cultiveront. Sur le milieu avec ampicilline et tétracycline, seules des colonies de type 1 pourront cultiver. On aura ainsi discriminé entre les deux types et repéré les clones qui nous intéressent, c'est-à-dire les clones recombinants de type 2.

Il est également possible de faire ce tri en procédant à l'extraction de l'ADN de chaque colonie susceptible de renfermer l'ADN étranger. On met alors en contact chaque ADN issu d'un clone avec un extrait bactérien riche en ARNm codant pour la protéine et un mélange d'acides aminés marqués. Si cet ADN ne porte pas le gène étranger, il ne pourra s'hybrider avec l'ARNm et il se formera une protéine marquée facile à détecter radiologiquement ou immunologiquement ; dans le cas contraire (présence du gène étranger), la synthèse de la protéine sera annulée ou diminuée.

4.2.2. Autres applications

Dans le domaine des applications et des perspectives, les potentialités du génie génétique apparaissent innombrables. Sur le plan médical, on a vu comment il était possible d'envisager la synthèse et la production d'**interférons** (avec un faible rendement pour l'instant) et toutes sortes de molécules de grande activité pharmacologique mais difficiles et coûteuses à préparer par les procédés classiques d'extraction et de purification : somatostatine, hormone de croissance… Le **vaccin contre l'hépatite B** pourrait aussi être fabriqué à partir de bactéries reprogrammées (hébergeant le gène viral). La synthèse de l'**insuline** à l'échelon industriel devient actuellement une réalité. Outre qu'elle abaisse considérablement le coût du traitement du diabète, la pureté de l'insuline obtenue garantit son excellente tolérance par rapport aux insulines d'origine animale. Le *tableau VI.2* donne quelques exemples d'applications importantes du génie génétique *(fig. VI.27 et VI.28)*.

Les protéines synthétisées doivent être pures, fonctionnelles, abondantes et faciles à extraire. Nombre de problèmes restent encore à résoudre. La protéine étrangère est parfois dégradée par les enzymes de la bactérie hôte sans que l'on sache contrôler le phénomène. La production médiocre de pro-insuline de rat (de 100 à 1 000 molécules par bactérie au lieu des 25 000 attendues) en est un exemple. D'autres protéines étrangères comme l'ovalbumine de poule sont en revanche élaborées en abondance (de 25 000 à 100 000 molécules par bactérie), sans aucune perte au cours du temps. Dans d'autres cas, la protéine synthétisée se révèle non fonctionnelle car la cellule bactérienne n'est pas en mesure de reproduire les modifications apportées dans la cellule *(fig. VI.28)*. D'autres applications concernent la production de **protéines alimentaires** capables de complémenter, voire de remplacer, les protéines animales ou végétales ou la synthèse de substances comme la **thaumatine**, un succédané du sucre. Un des grands espoirs est de domestiquer la **fixation directe de l'azote** atmosphérique pour fabriquer des biofertilisants peu coûteux.

La production d'**énergie** par les bactéries (alcool méthane), actuellement en plein développement, est susceptible d'être améliorée grâce aux techniques de recombinaison génétique.

La lutte contre la **pollution** engendrée par les déchets industriels toxiques (par exemple, les organochlorés) pourrait être ainsi redevable du génie génétique par transformation en substances biodégradables ou en éléments inoffensifs pour l'environnement.

Copyrighted material

Tableau VI.2 – Les premiers succès du génie génétique. *(D'après J. de Rosnay, Annales des mines, 1981).*

Produit fabriqué ou procédé	Espèce chimique	Date	Cellule réceptrice	Auteur	Observation
Somatostatine	Hormone du cerveau	Nov. 77	*E. coli*	H. Boyer	Première expression d'un gène étranger par *E. coli*
Insuline	Hormone du pancréas	Sept. 78	*E. coli*	H. Boyer	Biologiquement active
Ovalbumine	Protéine œuf de poule	Oct. 78		P. Kourilsky P. Chambon	
Dihydrofolate réductase	Protéine de souris	Oct. 78	*E. coli*	S. Cohen	Protéine de mammifère dans un colibacille
Globine	Protéine de souris	Sept. 79	Cellules de singe	P. Leder	Le vecteur utilisé est un virus, le SV 40
Hépatite B (antigène HBs)	Protéine virale	Mars 79 Avril 80 Août 80	*E. coli* Cellules de souris *E. coli*	K. Murray P. Tiollais C. Chany P. Tiollais	Expression de gène viraux dans cellules de souris en culture
Hormone de croissance	Protéine humaine	Juin 79 Juin 80	*E. coli* *E. coli*	H. Boyer F. Rougeon W. Roskam	
Interféron	Protéine humaine	Janv. 80	*E. coli*	C. Weissmann	
Résistance au méthothrexate		Avril 80	Cellules de la moëlle de souris	M. Cline	Gène de résistance à un médicament anticancéreux introduit dans des cellules de souris puis dans l'animal
Protéines	Protéines	Avril 80	*Methylococcus methylotrophus*		Hyperproduction de protéines pour l'alimentation
ß-endorphine	Hormone du cerveau	Juin 80	*E. coli*	J.D. Baxter	

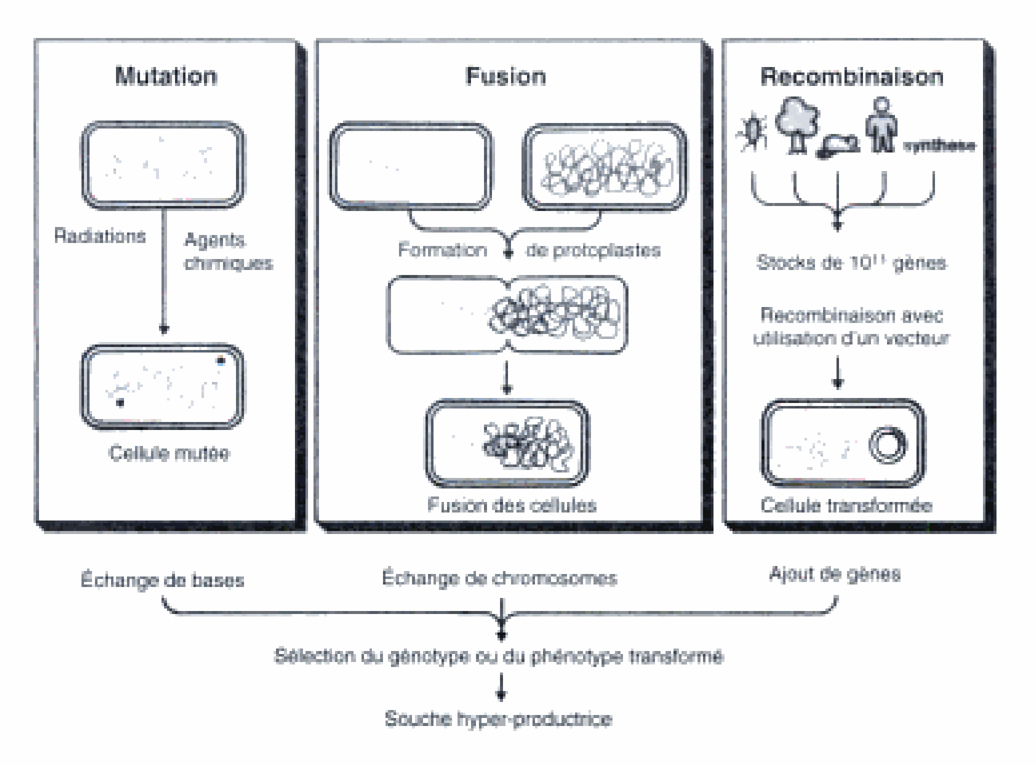


Figure VI.27 – Les différentes méthodes d'obtention de souches hyper-productrices.

Copyrighted material

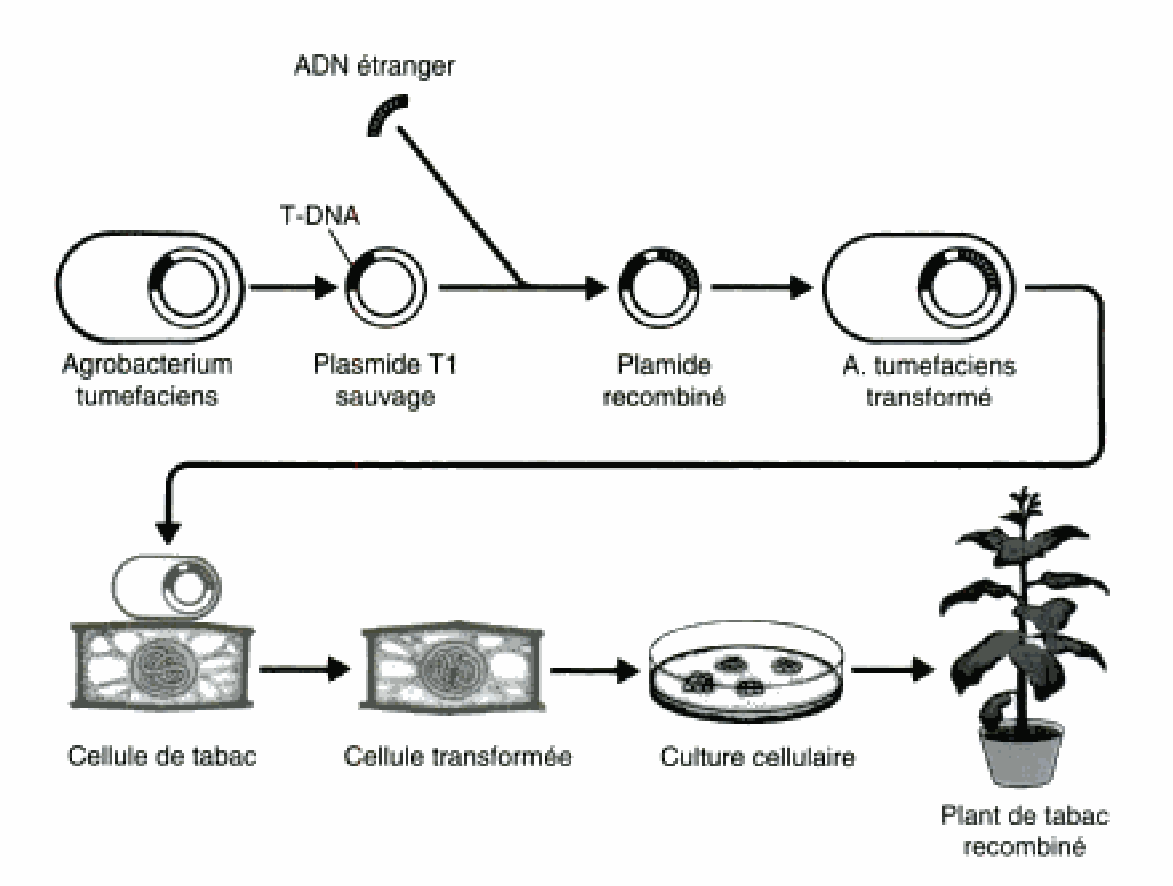
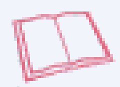


Figure VI.28 – Production d'une plante recombinée par utilisation du plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens*. Ce plasmide a la propriété d'être transféré naturellement dans les plantes ou il s'intègre dans le génome.

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

1. À l'aide des acquis du cours de biochimie de première et des expériences de Griffith et d'Avery, dégager le rôle de l'ADN bactérien comme support des caractères transmissibles.

2. Montrer qu'il existe des phénomènes modifiant des caractères transmissibles héréditairement.

3. Comment peut-on provoquer et déceler une mutation ?

4. Décrire le phénomène de mutation, citer ses principales caractéristiques.

5. À l'aide d'un exemple, donnez les principales caractéristiques de la transformation.

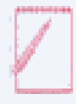
6. Qu'appelle-t-on conjugaison bactérienne ?

7. Quel est le rôle du facteur F ?

8. Quelles sont les similitudes et les différences entre la transduction restreinte et la transduction généralisée ?

9. Sous forme d'un tableau, comparez les trois types de transferts génétiques.

10. Présenter schématiquement les étapes de la production d'une protéine par génie génétique.



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes.

1. Le système de réparation de l'ADN par…………………………………… fait intervenir des activités enzymatiques (………………………, ……………………….., …………………… et…………..) pour exciser la séquence où se trouve la mutation et resynthétiser la séquence correcte.

2. Les mutations par « ………………….. », soit par addition d'une base (……………………..) ou par suppression d'une base (……………………), entraînent la modification du…………………………… lors de la traduction.

3. Les variations………………….. entraînent des modifications de…………………… des bactéries se matérialisant par une modification de l'aspect des colonies sur milieu gélosé. Cette mutation est appelée……………………………..

4. Une mutation…………………….. au niveau de la………………… entraîne la perte de la virulence. On parle de mutation…………………………

5. Lors du transfert génétique par………………………., un ADN exogénote, appelé ADN………………….., pénètre dans une bactérie, appelée bactérie réceptrice, s'intègre dans son génome (ADN……………………) et fait acquérir à la cellule le ou les caractères génétiques qu'il porte.

6. Le système de conjugaison………., signifiant…………………………………………, se distingue de la conjugaison $F^{+} \times F^{-}$ par le fait qu'il est plus efficace et que le facteur F est intégré à l'exogénote (……………………).

7. Dans la transduction……………………., le phage transducteur entraîne dans un premier temps un cycle lytique dans une bactérie A où il peut encapsider un fragment quelconque du génome bactérien et donner ainsi certains virions…………………. Ceux-ci, infectant une bactérie B réceptrice……………………, lui permettront d'intégrer et d'exprimer le fragment d'ADN ainsi transféré.

8. Le……………………….. permet de détecter et de quantifier la présence d'un éventuel agent mutagène. Il est fondé sur le fait qu'une bactérie mutante …………………….. peut voir sa mutation ………………… en présence de l'agent suspecté et ainsi être sélectionnée spécifiquement sur milieu minimum.

9. La préparation d'un……………….. est réalisée en faisant agir, sur un fragment d'………. messager choisi, une enzyme appelée………………………………… afin d'obtenir la séquence d'ADN correspondant à la protéine que l'on désire produire.

10. Le couplage d'un fragment d'ADN que l'on veut cloner dans une bactérie à un ADN vecteur nécessite que les ADN donneur et vecteur aient été traités par les mêmes…………………………………… afin d'obtenir des……………………………. permettant à l'ADN donneur (appelé……………….) d'être intégré dans l'ADN vecteur qui sera appelé alors……………………………..

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. Le système de réparation SOS est caractérisé par le fait que la réplication n'est pas interrompue par la présence d'une lésion sur le brin matrice.

2. Le taux de mutation représente en fait la proportion de mutants dans une population bactérienne donnée.

3. Lors d'une mutation par substitution de base, la transversion désigne le remplacement d'une base purique par une autre base purique ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique.

4. Le transfert génétique par transformation est caractérisé par le fait qu'aucun contact de la bactérie réceptrice avec une autre bactérie ou un phage donneur n'est nécessaire.

5. Lors du phénomène de transfert génétique par transformation, l'ADN exogénote doit être impérativement monocaténaire.

6. Lors du phénomène de conjugaison, les mutants « Hfr » sont caractérisés par le fait que le facteur F est intégré au génome de la cellule donatrice.

7. Lors d'une conjugaison, si l'on n'interrompt pas volontairement le contact entre bactéries donatrices et réceptrices, l'exogénote entier sera systématiquement transféré.

8. Le fait que le facteur F soit intégré au génome bactérien (conjugaison Hfr) a pour conséquence que le transfert ne pourra se faire que dans une direction donnée à partir de l'épisome et non dans un sens ou dans l'autre comme dans le transfert $F^+ \times F$.

9. La conversion lysogénique est en fait un exemple de transduction généralisée lors de laquelle un bactériophage défectif ayant un fragment de génome bactérien vient à transduire une bactérie lysogène.

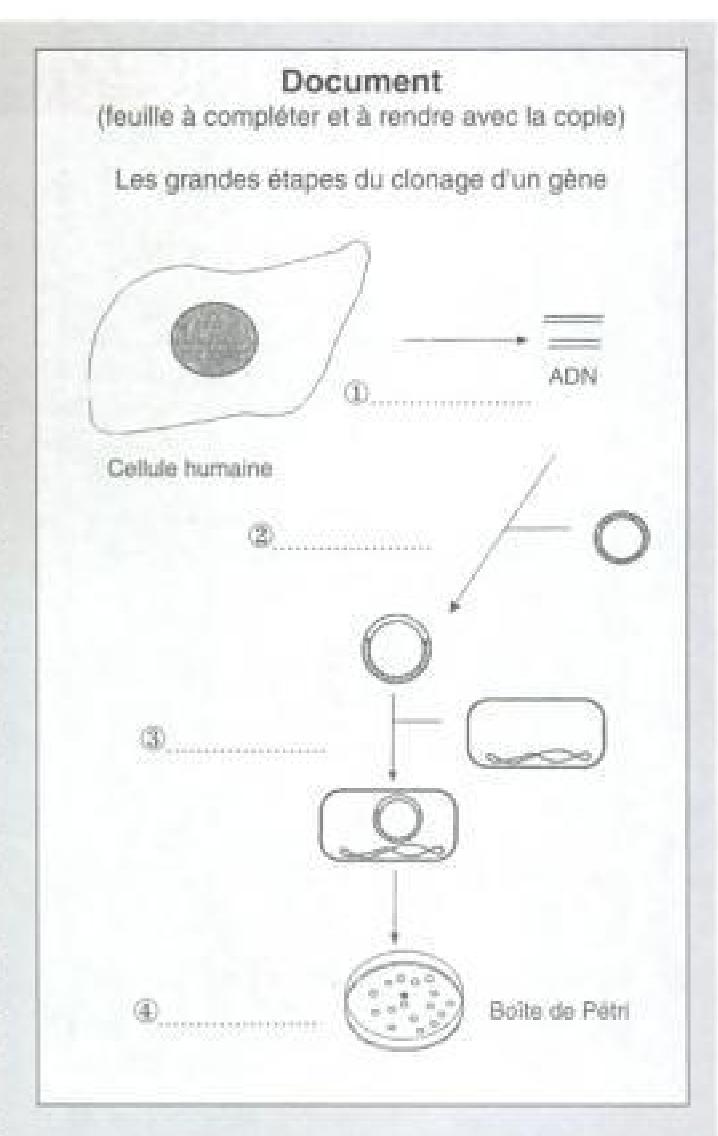
10. Lors de la construction d'un plasmide recombinant, il est indispensable que l'ADN à cloner (insert) et l'ADN plasmidique (vecteur) aient été traités préalablement par les mêmes enzymes de restriction.

3. Production de *B. subtilis* par génie génétique

Des bactéries, dont *B. subtilis*, sont souvent utilisées pour produire en grande quantité certaines protéines humaines par génie génétique. Le vecteur de clonage le plus utilisé est le plasmide.

1. Définir un plasmide.

2. Compléter le document de la figure ci-dessous en indiquant les différentes étapes du clonage.



4. Conjugaison chez *E. coli* (1)

Cinq souches Hfr A à E dérivent de la même souche F^+ d'*E. coli*. Le tableau suivant montre le temps d'entrée des cinq premiers marqueurs dans une souche F quand chacun est utilisé dans l'expérience de conjugaison interrompue.

1. Construire une carte chromosomique de la souche F^+ montrant les positions de tous les gènes et les distances qui les séparent en minutes.

2. Montrer le point d'insertion et l'orientation du plasmide F dans chaque Hfr.

3. En utilisant chacune de ces souches Hfr, montrer quel gène sélectionner pour obtenir la plus haute proportion de conjugants Hfr.

A	B	C	D	E
mal^+ (1)	ade^+ (13)	pro^+ (3)	pro^+ (10)	his^+ (7)
strs (11)	his^+ (28)	met^+ (29)	gal^+ (16)	gal^+ (17)
ser^+ (16)	gal^+ (38)	xyl^+ (32)	his^+ (26)	pro^+ (23)
ade^+ (36)	pro^+ (44)	mal^+ (37)	ade^+ (41)	met^+ (49)
his^+ (51)	met^+ (70)	stls (47)	ser^+ (61)	xyl^+ (52)

Copyrighted material

5. Conjugaison chez *E. coli* (2)

On mélange une souche d'*E. coli* Hfr : Lac^+ Mal^+ The^+ His^+ Leu^+ Str^S avec une souche d'*E. coli* F^- : $Lac^-Mal^-Thr^-His^-Leu^-Str^r$. Quatre échantillons du mélange sont prélevés aux temps t_1 = 7 minutes, t_2 = 12 minutes, t_3 = 20 minutes, t_4 = 50 minutes et vigoureusement agités (par passage au vortex). Chacun des échantillons est étalé sur 3 milieux de culture :

– milieu A : milieu minéral minimum + str lac his thr leu ;

– milieu B : milieu minéral minimum + str his glucose ;

– milieu C : milieu minéral minimum + str glucose.

Au temps t_1, il n'y a aucune croissance sur les milieux ; il y a croissance à t_2 sur le milieu B, à t_3 sur les milieux A et B, à t_4 sur les 3 milieux.

1. Sachant que le glucose est utilisé de façon constitutive et inhibe l'utilisation des disaccharides, donner les génotypes (pour les 6 caractères étudiés) des souches qui se développent sur les 3 milieux.

2. Interpréter les résultats des expériences aux temps t_1, t_2, t_3 et t_4.

3. Peut-on établir une carte chromosomique pour les caractères étudiés ?

6. Transduction généralisée

Dans un système de transduction généralisée utilisant le phage P2, le donneur est pur^+ nad^+ pdx^- et le receveur est pur^- nad^- pdx^+.

L'allèle pur^+ donneur a été initialement sélectionné après transduction et 50 transductants pur^+ ont été analysés pour les autres allèles présents. Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Génotypes	Nombre de colonies
nad^+ pdx^+	3
nad^+ pdx^-	10
nad^- pdx^+	24
nad^- pdx^-	13
Total	50

1. Quelle est la fréquence de cotransduction de pur et nad ?

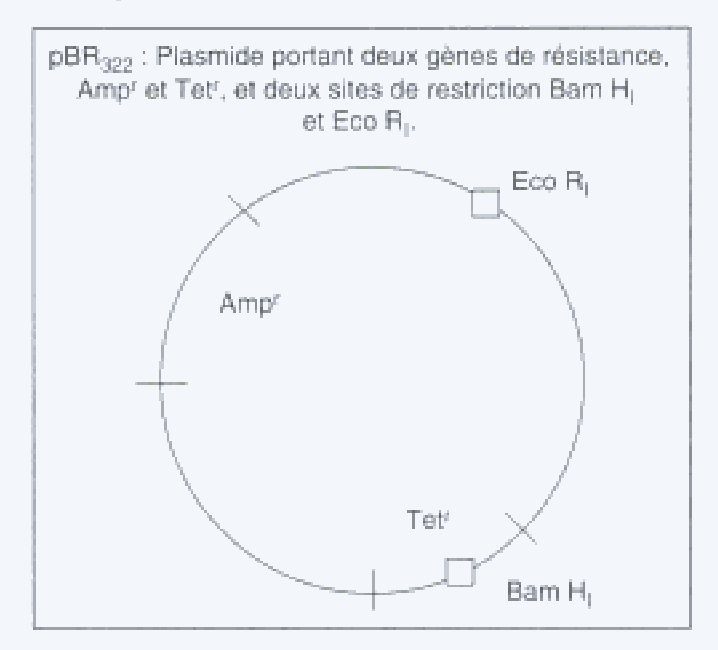
2. Quelle est la fréquence de cotransduction pur et pdx ?

3. Quel locus non sélectionné est le plus proche de pur ?

7. Transformation

1. Définir la transformation. Indiquer dans quelles conditions ce phénomène peut avoir lieu.

2. En génétique bactérienne, lors d'une transformation, il est également indispensable d'avoir un moyen de sélection du recombinant. Très souvent, c'est un caractère de résistance à un antibiotique qui est utilisé. Par exemple, on réalise la transformation d'*E. coli* sensible à l'ampicilline et à la tétracycline (Amp^s et Tet^s) avec différents plasmides (voir figure ci-dessous).



Après avoir mis *E. coli* en état de compétence, on réalise quatre essais :

– un essai sans plasmide ;

– un essai avec le plasmide pBR_{322} ;

– un essai avec le plasmide pBr_{322} (Bam H_I) ;

– un essai avec le plasmide pBR_{322} (Eco R_I).

Chaque essai est étalé sur une gélose nutritive à l'ampicilline, puis incubé 24 heures à 37 °C.

2.1. Quel est l'intérêt du premier essai ? Indiquer ce que l'on observe sur chaque gélose si la transformation a bien eu lieu.

2.2. Autour des colonies ampicillines résistantes, on observe la croissance de toutes petites colonies. Expliquer ce phénomène.

2.3. On réalise ensuite une réplique sur gélose nutritive à la tétracycline. Indiquer ce que l'on observe, pour les quatre essais, au bout de 24 heures d'incubation à 37 °C. Justifier.

CORRIGÉS

1. Compléter

1. Excision-resynthèse, endonucléase, exonucléase, polymérase et ligase.

2. Modification, insertion, délétion, cadre de lecture.

3. S → R, structure, mutation morphologique.

4. Morphologique, capsule, pléiotropique.

5. Transformation, transformant, endogénote.

6. Hfr, haute fréquence de recombinaison, épisome.

7. Généralisée, défectifs, lysogène.

8. Test d'Ames, auxotrophe, réversée.

9. ADNc, ARNm, transcriptase inverse.

10. Enzymes de restriction, extrémités cohésives, insert, ADN recombinant.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Vrai.

2. Faux : il exprime la probabilité d'apparition d'une mutation dans un intervalle de temps correspondant à une génération.

3. Faux : La transversion concerne le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique ou l'inverse. Le remplacement purine-purine ou pyrimidine-pyrimidine s'appelle transition.

4. Vrai.

5. Faux : il doit être bicaténaire, bien que lors de la phase de pénétration ? un des deux brins soit dégradé.

6. Vrai.

7. Faux : le transfert intégral est très rare, la conjugaison s'interrompant d'elle-même.

8. Faux : dans les deux cas ? le transfert est orienté par rapport à un point nommé « origine de transfert ».

9. Faux : le bactériophage doit être présent. Il n'est pas un simple vecteur d'information, il la porte sur son propre génome. S'il est absent, la bactérie n'acquiert pas le caractère. S'il est présent, il lysogénise la bactérie qui exprimera le caractère.

10. Vrai.

3. Production de *B. subtilis* par génie génétique

1. Acide désoxyribonucléique extrachromosomique, de petite taille (1/100 du génome bactérien), circulaire torsadé, se répliquant indépendamment du chromosome, transférable d'une bactérie à une autre (transformation, conjugaison, transduction), porteur de caractères de résistance aux antibiotiques.

2. (1) Extraction de l'ADN étranger. (2) Insertion dans un vecteur plasmidique donnant un plasmide recombinant. (3) Transformation de la cellule hôte par le plasmide recombinant. (4) Sélection des souches recombinantes.

4. Conjugaison chez *E. coli* (1)

1.

* Hfr A :

…his — ade — ser — str — mal…

15 20 5 10

Le premier caractère transmis est mal à 1 minute suivi de str à 11 minutes après le début de l'expérience, soit 10 minutes après mal, ser vient 5 minutes après str, etc..

* Hfr B :

…met — pro — gal — his — ade…

26 6 10 15

* Hfr C :

…str — mal — xyl — met — pro…

10 5 3 26

* Hfr D :

…ser — ade — his — gal — pro…

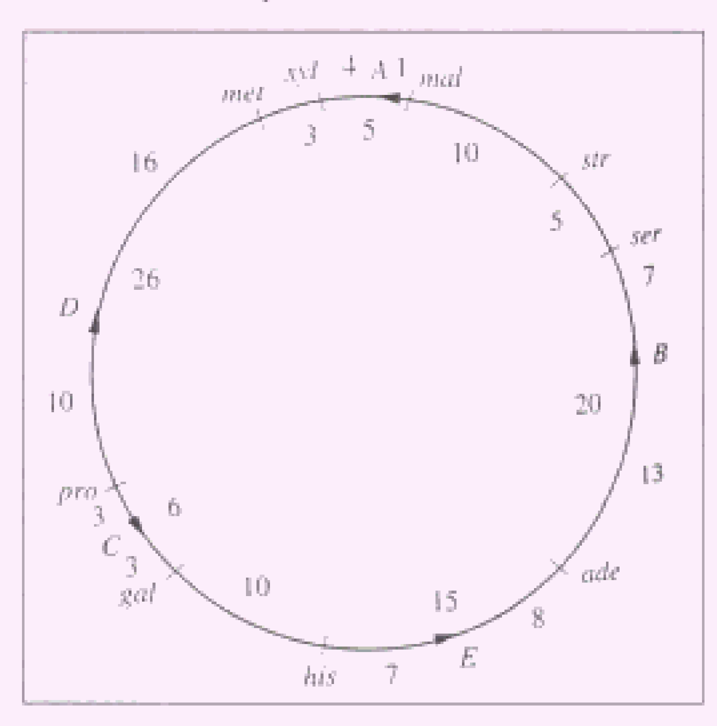
20 15 10 6

* Hfr E :

…xyl — met — pro — gal — his…

3 26 6 10

* Carte chromosomique ci-dessous.



2.

– Insertion Hfr A avant mal (entre mal et xyl) ; orientation en sens inverse des aiguilles d'une montre.

– Insertion Hfr B avant ade (entre ade et ser) ; orientation en sens inverse des aiguilles d'une montre.

– Insertion Hfr C avant pro (entre pro et gal) ; orientation en sens inverse des aiguilles d'une montre.

– Insertion Hfr D avant pro (entre pro et met) ; orientation en sens des aiguilles d'une montre.

– Insertion Hfr E avant his (entre his et ade) ; orientation en sens inverse des aiguilles d'une montre.

3. Sélection des derniers gènes à être transférés :

– pour Hfr A : xyl ;

– pour Hfr B : ser ;

– pour Hfr C : gal ;

– pour Hfr D : met ;

– pour Hfr E : ade.

5. Conjugaison chez *E. coli* (2)

1.

– Milieu A : souches Str^r Lac^+.

– Milieu B : souches Str^r Thr^+ Leu^+.

– Milieu C : souches Str^r Thr^+ Leu^+ His^+.

2.

– t_1 : aucun transfert de Hfr à F^-.

– t_2 : transfert Thr^+ et Leu^+.

– t_3 : transfert Thr^+, Leu^+, Lac^+.

– t_4 : transfert Thr^+, Leu^+, Lac^+, His^+.

3. Ordre de passage : Thr, Leu, Lac et His ou Leu, Thr, Lac et His.

6. Transduction généralisée

1. Cotransduction pur^+ et nad^+ : 10 colonies nad^+ avec pdx^- et 3 colonies nad^+ avec pdx^+. Soit 13 colonies cotransductantes pur^+ nad^+ sur les 50 testées (26 %).

2. Cotransduction pur^+ et pdx^- : 10 colonies pdx^- avec nad^+ et 13 colonies pdx^- avec nad^-. Soit 23 colonies cotransductantes pur^+ pdx^- sur les 50 testées (46 %).

3. Comme il y a le double de cotransductants pur pdx par rapport à pur nad, c'est le locus pdx qui est le plus proche de pur.

7. Transformation

1. Passage d'un ADN dans une cellule sans contact aucun ni par l'intermédiaire d'un bactériophage. La cellule réceptrice est « transformée », elle acquiert les caractères génomiques de l'ADN transféré. Il est nécessaire que la cellule réceptrice soit « compétente » et que l'ADN transformant soit de taille moyenne, bicaténaire et fortement concentré.

2.1.

Sans plasmide	Témoin : pas de culture souche sensible à l'ampicilline
Plasmide pBR_{322}	Culture, bactérie ayant acquis le caractère AmpR
Plasmide pBR_{322} ($BamH_1$)	*Idem*
Plasmide pBR_{322} ($EcoR_1$)	*Idem*

2.2. Satellitisme par production de lactamase excrétée.

2.3.

Sans plasmide	Pas de culture souche sensible à la tétracycline
Plasmide pBR_{322}	Culture, bactérie ayant acquis le caractère Tet^R
Plasmide pBR_{322} ($BamH_1$)	Pas de culture, bien que transformée, la coupure au niveau du site BamH1 a détruit le gène de résistance à la tétracycline
Plasmide pBR_{322} ($EcoR_1$)	Culture, bactérie ayant acquis le caractère Tet^R

Copyrighted material

Chapitre 7

Micro-organismes et milieu

L'**écologie** s'intéresse aux interactions des organismes avec leur milieu. Elle est microbienne lorsqu'il s'agit de micro-organismes. Cette science est entrée dans sa phase moderne à partir du moment où il est devenu possible de **quantifier**, c'est-à-dire d'évaluer, la densité des organismes et la proportion des différentes espèces. De même, de notables progrès ont été réalisés en considérant les flux d'énergie chimique et de carbone captés et transformés par les systèmes vivants. Il est ainsi possible de comparer les productivités représentatives des différents **écosystèmes** : micro-organismes, zooplancton, phytoplancton et, au-delà, plantes vertes, herbivores, carnivores, etc.

L'objectif de l'écologie est donc d'analyser et de comprendre les forces en jeu et d'en évaluer les capacités productives. L'écologiste se voit aussi confier par la société le soin de maintenir la planète en l'état pour le bien-être de l'homme et pour sa santé.

1. Écologie microbienne du milieu naturel

1.1. Principales flores

1.1.1. Océans

L'écologie marine a pour finalité la connaissance de la structure et du fonctionnement des écosystèmes marins. Elle a la charge de la gestion et de la protection du milieu marin.

Les océans constituent une source de matière organique pratiquement inépuisable pour l'homme. La fertilité des océans est directement en rapport avec leur capacité de produire du plancton, c'est-à-dire une flore et une faune variées comprenant des bactéries, des algues, des protozoaires, des champignons et des levures. Lorsque cette population est à prédominance d'algues, on parle de **phytoplancton** ; si, au contraire, les protozoaires sont en majorité, on l'appelle **zooplancton**. Les formes bactériennes les plus fréquentes sont des bacilles à Gram négatif des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Cellvibrio*. Les espèces à Gram positif sont plus faiblement représentées : *Bacillus*, *Clostridium*. Les grands cycles de la matière vivante évoluent sous l'influence des multiples activités bactériennes.

L'exploitation biologique des océans porte sur plusieurs secteurs : halieutique, aquaculture, conchyliculture, bioconversion des algues géantes et, bientôt, bio-extraction d'ions lourds (or, uranium, etc.).

Copyrighted material

La productivité marine doit tenir compte de l'impact des pollutions chimiques et microbiennes. Une politique de protection, donc d'assainissement, est aujourd'hui justifiée au même titre que celle de la préservation des ressources vivantes.

1.1.2. Eaux douces

Les bactéries sont les éléments clés du cycle biologique normal des eaux douces. Ce sont elles, en effet, qui vont débarrasser le milieu des matières organiques en solution qu'il contient. Le résultat est une augmentation considérable de la masse microbienne qui devient alors la proie des protozoaires prédateurs. Ces formes animales les plus rudimentaires servent elles-mêmes de nourriture aux vairons et aux petits poissons. Les plus gros poissons dévorent les petits et l'homme se sert des uns et des autres pour son alimentation. Les déchets organiques qu'il renvoie à la rivière assurent la multiplication microbienne et le cycle est ainsi fermé.

Les eaux de surface assurent en outre le développement des algues qui se multiplient par photosynthèse et grâce aux sels minéraux en dissolution dans l'eau puis qui deviennent la nourriture des protozoaires ou des poissons.

Il en résulte un équilibre biologique naturel à l'image de ce qui se passe dans le sol. C'est un véritable processus de minéralisation qui s'opère, faisant intervenir les différents micro-organismes spécialisés dans les cycles du carbone, de l'azote, etc., la minéralisation profitant elle-même aux algues photosynthétiques.

Cette capacité **auto-épuratrice** a des limites. Elle est efficace dans la mesure où la charge de pollution ne devient pas excessive. Elle dépend étroitement du métabolisme des micro-organismes présents et de leur nombre, c'est-à-dire de la disponibilité en oxygène du milieu. Le taux d'oxygène dissous est conditionné par deux types de facteurs : la consommation biochimique d'oxygène exigée par les micro-organismes pour transformer les matières organiques polluantes et la réabsorption d'oxygène à la surface du cours d'eau.

La flore bactérienne auto-épuratrice de l'eau est en faible partie **libre**, en suspension dans l'eau (< 1 %), ou adhérente aux végétaux et aux animaux **(épipsamnique)**, ou encore **épibenthique** sur les berges et le lit de la rivière, ou enfin **benthique** dans les couches limoneuses profondes.

1.1.3. Sol

Le sol a été défini comme « la partie de la croûte terrestre où la géologie et la biologie se rencontrent ». C'est en effet un milieu vivant sur un support organique et minéral solide. La flore microbienne **tellurique** est très variée et comprend des bactéries, des champignons, des algues, des protozoaires et des virus. Les bactéries sont les représentants les plus importants de ce microcosme. Leur dénombrement en révèle plusieurs milliards par gramme, par lecture microscopique directe, mais seulement une très faible fraction (à peine le 1/100) par culture. Ce sont des autotrophes ou des hétérotrophes, des aérobies ou des anaérobies, des mésophiles, des psychrophiles ou des thermophiles. Ce sont aussi des types spécialisés dans la dégradation de la cellulose de la lignine, de la pectine, des réducteurs de sulfates et des oxydants du soufre, des fixateurs d'azote et des nitrificateurs, etc. Tous ces micro-organismes abondent, en particulier au niveau des racines végétales qui libèrent des composés utiles à leur croissance. Cette région du sol où se développent les racines végétales en parfaite symbiose avec la prolifération bactérienne s'appelle la **rhizosphère**.

Parmi les bactéries, le groupe des actinomycètes occupe une place privilégiée. Ceux-ci sont en effet relativement importants en nombre puisqu'ils peuvent atteindre plusieurs millions par gramme. Les genres prédominants sont les *Streptomyces*, les *Nocardia* et les *Micromonospora*. Ce sont eux qui donnent à la terre fraîchement remuée le goût de moisi caractéristique (terreux). Ce sont aussi des agents très actifs dans la décomposition de substrats résistants comme la cellulose, la chitine, la kératine, la lignine, etc. Les actinomycètes sont enfin bien connus pour leur capacité de synthèse d'antibiotiques nombreux et variés.

Des centaines d'espèces de champignons sont aussi présentes dans le sol. Ces champignons se développent en surface et s'insèrent dans les couches superficielles par leur prolongement mycé-

Copyrighted material

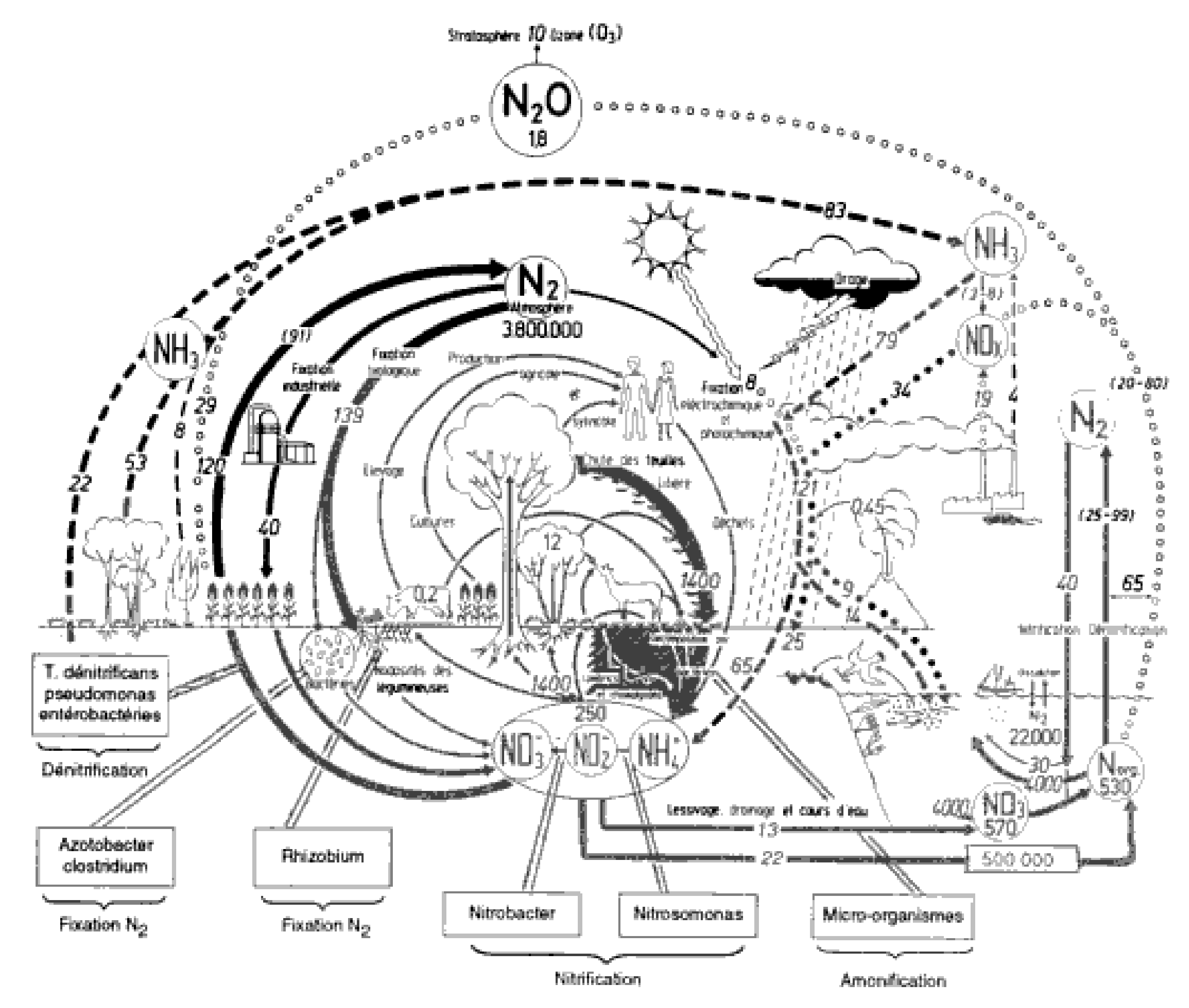


Figure VII.2 – **Cycle de l'azote dans le monde. Quantités totales (chiffres droits) en 10^6 t. Flux (chiffres en italique en 10^6 t/an).**

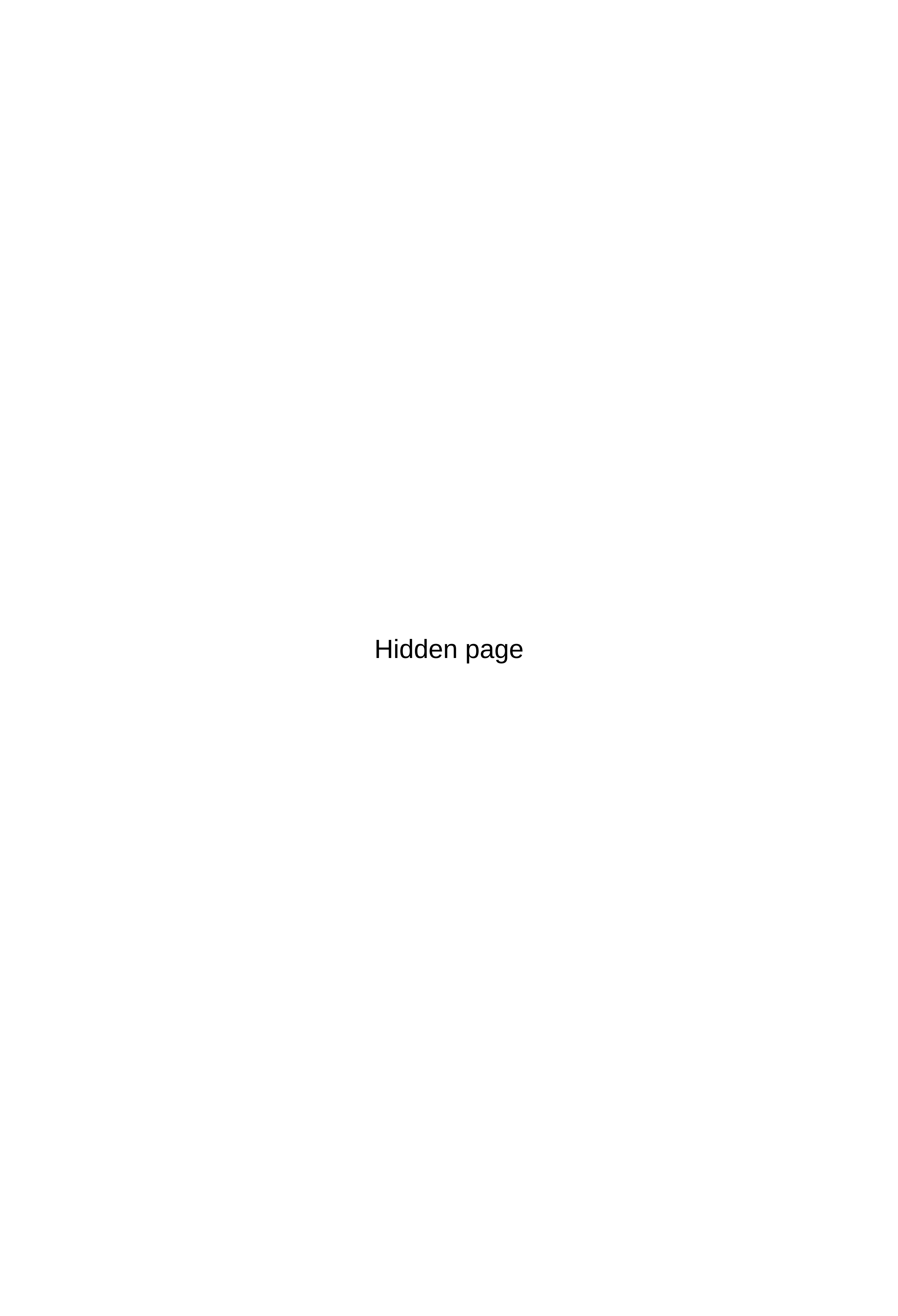
fiantes : les *Nitrosomonas* qui oxydent l'ammoniac en nitrites puis les *Nitrobacter* qui oxydent les nitrites en nitrates.

Au cours d'une autre étape d'importance secondaire, la **dénitrification**, c'est-à-dire la réduction des nitrates en azote, un faible pourcentage des nitrates précédemment formés est dégradé jusqu'au stade final d'azote moléculaire, reconstituant ainsi une partie de la réserve atmosphérique. Les agents directement impliqués dans cette transformation sont soit des micro-organismes spécialisés comme *T. denitrificans* ou *Micrococcus denitrificans*, soit des bactéries appartenant à des genres communs : *Pseudomonas, Achromobacter* et certaines entérobactéries. Les nitrates ou l'azote moléculaire produits grâce à l'activité microbienne sont disponibles pour les plantes vertes qui les exigent pour satisfaire leur synthèse protéique.

Les nitrates sont réduits, au niveau cellulaire, en ammoniac qui est greffé par amination sur des intermédiaires métaboliques, avec formation de deux acides aminés principaux : l'acide glutamique et l'acide aspartique. Ces constituants sont alors intégrés dans les chaînes de biosynthèse qui donnent naissance à des composés azotés : protéines et acides nucléiques.

L'azote atmosphérique peut être assimilé directement grâce à l'intervention de micro-organismes. La fixation de l'azote résulte alors de l'association étroite et indispensable entre la plante et les microbes, association qui a reçu le nom de **symbiose**. Elle a été particulièrement bien étudiée

Copyrighted material


Hidden page

légumineuses constituent un exemple remarquable de ces effets bénéfiques. Dans certaines conditions particulières, le carbone organique peut s'accumuler au cours des ères géologiques, formant alors d'énormes dépôts que l'homme peut exploiter. La tourbe n'est autre que de la matière humique entassée durant des siècles sous l'effet de facteurs favorables (en milieu très humide et acide).

La compression de ces masses quelquefois gigantesques, dans des conditions climatiques privilégiées, aboutit à la formation de charbon. De même, il est généralement admis que le pétrole est un sous-produit de l'incessante activité microbienne. Les hydrocarbures qui le constituent ainsi que les composés de l'azote, du soufre réduit, du phosphore, etc., font penser à une origine organique. Les conditions physico-chimiques de la formation du pétrole semblent parfaitement compatibles avec une activité microbiologique : température comprise entre 30 et 80 °C, pression, anaérobiose, salinité, etc. Certaines études expérimentales tendant à reproduire le phénomène constituent un argument favorable à une théorie qui n'a malheureusement jamais été confirmée totalement. Les **gaz naturels** proviendraient aussi vraisemblablement de l'activité métabolique de bactéries méthanogènes. Il est admis que la formation de nombreux gisements de soufre natif, notamment des dômes de soufre du Texas et de Floride, proviendrait de la réduction biologique de sulfates par les bactéries sulfato-réductrices.

À l'inverse, les bactéries du sol peuvent jouer un rôle néfaste en parasitant les espèces végétales et en provoquant des altérations. Parmi les bactéries, *Agrobacterium tumefaciens* est responsable de tumeurs *(crown galls)* bien connues des horticulteurs. Les *Erwinia* produisent des nécroses, des ramollissements, des pourritures chez certaines plantes ou sur des fruits. Les *Xanthomonas* sont étroitement adaptés à des espèces qu'ils parasitent. C'est aussi le cas des champignons phytopathogènes, de virus (mosaïque du tabac, etc.).

2. Écologie microbienne de l'homme et des animaux

2.1. Généralités

Si de nombreux micro-organismes participent à l'équilibre biologique existant à la surface de la Terre et même le conditionnent, d'autres au contraire tendent à détruire cette harmonie. Ils sont hautement nuisibles à l'homme ou aux animaux en provoquant chez eux des troubles plus ou moins graves. Ce sont des micro-organismes pathogènes.

Cependant, les relations qui existent entre les micro-organismes et un hôte sont loin d'être toujours néfastes, bien au contraire, cette conséquence fâcheuse est la plus rare.

Schématiquement, on distingue deux principaux types de relations entre les micro-organismes et l'hôte.

2.1.1. Symbiose

Au sens étymologique, symbiose signifie « vie avec », c'est-à-dire un mode de vie ou micro-organismes et hôte sont étroitement associés. Ce terme revêt une signification très large ; il pourrait définir, en fait, presque tous les types de relations entre les micro-organismes et l'hôte, utiles aussi bien que nuisibles.

On l'emploie plus communément dans un sens restreint pour désigner le mode de coexistence au cours duquel les deux partenaires tirent un bénéfice substantiel de leur association. Telle est la fructueuse coopération qui existe entre les ruminants et les micro-organismes du **rumen** (panse) qui digèrent la cellulose. Cette symbiose est la condition *sine qua non* de l'existence des uns et des autres. Sans ces micro-organismes, le ruminant ne pourrait satisfaire ses besoins alimentaires : la cellulose ne pourrait être décomposée en ses éléments simples (sucres) ni, donc, lui fournir toute l'énergie nécessaire à leur synthèse. D'un autre côté, les micro-organismes en tirent un substantiel bénéfice puisque le rumen constitue, pour

Copyrighted material

Faisons deux expériences pour bien opposer les deux phénomènes. Introduisons sous la peau d'un cobaye une écharde souillée de bacilles tétaniques. Les bacilles vont se multiplier au niveau de la plaie sans jamais pénétrer plus avant mais ils élaborent une toxine qui, en diffusant le long des filets nerveux, va parvenir jusqu'au système nerveux central. Elle sera alors responsable de tous les symptômes de la maladie et principalement des contractions permanentes des muscles. Le pouvoir pathogène du bacille tétanique est dû uniquement à sa toxine synthétisée *in situ*. Inoculons maintenant une souris par voie intrapéritonéale avec une suspension de pneumocoques encapsulés. Au bout de 24 à 48 heures, l'animal meurt. Après autopsie, on constate que les pneumocoques peuvent être isolés du sang du cœur et pratiquement de tous les organes : foie, reins, poumons, etc. Les pneumocoques ont pénétré dans l'organisme, sont passés dans la circulation sanguine puis se sont répandus dans tous les organes de celui-ci. On dit qu'ils sont virulents. Leur pouvoir pathogène est dû uniquement à leur aptitude particulière à pénétrer et à se multiplier activement dans les organes de l'hôte en dépit de l'énergique défense que celui-ci ne va pas manquer de leur opposer.

3.2. Mesure d'effet létal

3.2.1. Dose minimale mortelle (DMM)

On appelle DMM la dose minimale tuant, dans un délai déterminé, des animaux de race, de poids et d'âge déterminés. En principe, une telle méthode ne recourt pas aux calculs statistiques. Toutefois, ses résultats ne sont pas toujours facilement interprétables, ainsi que le montre l'exemple du *tableau VII.1* : 0,5 mg pourrait être considéré comme la DMM, mais une dose 4 fois plus faible tue quand même 40 % des animaux, tandis qu'une dose 2 fois plus forte n'en tue que 80 %. De tels résultats sont loin d'être exceptionnels et ne permettent pas la détermination d'une DMM.

3.2.2. Détermination de la dose létale 50 % (DL_{50})

La DL_{50} est la dose minimale tuant 50 % des animaux inoculés. L'appréciation d'une telle dose n'est souvent pas possible directement : dans l'exemple précité, 50 % de mortalité correspondrait à la mort de 2,5 animaux ; 0,125 serait la dose

Tableau VII.1 – Détermination de la dose minimale mortelle (DMM).

Dose en mg	Nombre d'animaux	Survivants	Morts	Pourcentage de mortalité
0,0625	5	4	1	20
0,125	5	3	2	40
0,25	5	4	1	20
0,5	5	0	5	100
1	5	1	4	80
2	5	0	5	100
4	5	0	5	100

se rapprochant le plus du résultat souhaité ; toutefois, les résultats obtenus avec les doses voisines font douter de sa valeur. Aussi, différentes méthodes vont-elles permettre ce calcul.

• **Méthode graphique**. On établit une représentation graphique de l'évolution des pourcentages de mortalité (s'étalant de façon à peu près égale de part et d'autre de 50 %) en fonction du logarithme des doses inoculées *(fig. VII.4)*. Cette méthode permet de prendre, dans l'exemple précédent, la dose de 0,25 mg comme DL_{50}. Toutefois, dans cette méthode, on ne raisonne qu'en fonction des résultats obtenus lors d'une seule série d'expérimentations, résultats qui peuvent varier d'une série expérimentale à l'autre.

• **Méthode mathématique**. Elle permet de calculer l'erreur standard (Es) d'une dose j déterminée (comme la DL_{50}) par la formule :

$$Es = 1/a.p.n.v.$$

avec Es : erreur standard d'une dose x ; a : coefficient directeur de la droite ; p : nombre de points de mesure ; n : nombre d'animaux de chaque groupe ; v : valeur moyenne d'une observation.

• **Méthode de Karbes et Behrens**. On ne tient compte ici que du nombre d'animaux tués dans chaque dilution. Pour deux dilutions voisines, on calcule le nombre total d'animaux morts que l'on divise par deux. Soit b ce chiffre (un exemple

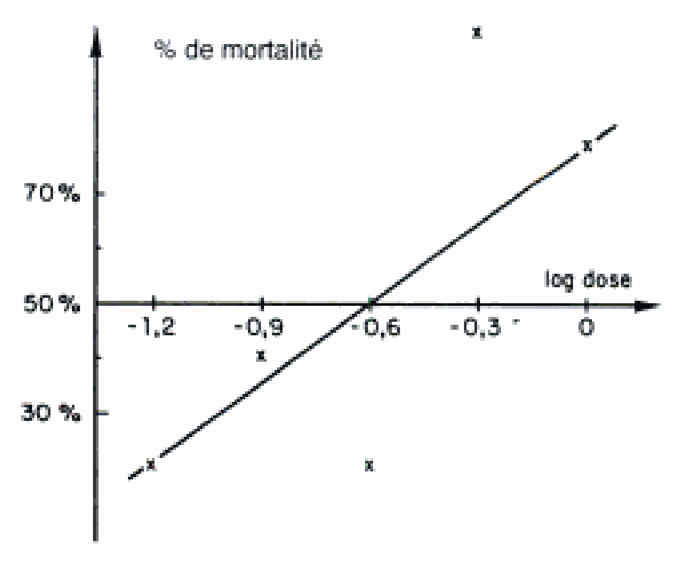


Figure VII.4 – Détermination graphique de la DL_{50}.

Copyrighted material

concret exposé au *tableau VII.2* permettra de mieux comprendre ce calcul simple). Soit *a* la différence de titre entre les dilutions successives. La DL_{50} est donnée par la formule :

$$DL_{50} = DL_{100} - E\,(ab)/n$$

avec E : constante ; *n* : nombre total d'animaux inoculés.

Tableau VII.2 – Calcul de la DL_{50} par la méthode de Karres et Behrens.

Dilutions	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Nombre d'animaux inoculés	10	10	10	10	10
Animaux morts	10	8	6	4	2
Demi-somme des animaux morts (b)	9	7	5	3	
Produits a b	90	70	50	30	

3.3. Notion de virulence

La virulence, ou « pouvoir invasif », était opposée à la toxinogenèse pour faire référence à la capacité de certains germes de se multiplier dans les tissus de l'hôte (malgré les moyens de défense de celui-ci) comme les bacilles de la peste et du charbon, le pneumocoque.

En fait, la notion de virulence traduit une échelle, un degré d'expression de la pathogénicité. Elle se mesure expérimentalement en particulier par les méthodes qui viennent d'être décrites. Une souche A est plus virulente qu'une souche B (de la même espèce) si un nombre plus faible de bactéries A est capable d'induire la maladie.

Les germes virulents possèdent des structures ou des constituants spéciaux qui les protègent efficacement, en particulier de la phagocytose.

La virulence dépend aussi de l'hôte et de ses facultés de résistance. Cette résistance est fonction de l'espèce animale, de la race, de l'individu, de son âge et de tout facteur susceptible de modifier ou de diminuer ses moyens de défense.

3.3.1. Facteurs liés au germe

3.3.1.1. Fixation-adhésion

La plupart des infections débutent par l'attachement de l'agent pathogène aux muqueuses respiratoires, digestives ou urogénitales, selon les cas. Cet attachement est un préliminaire indispensable permettant à l'envahisseur d'éviter son expulsion par les phénomènes mécaniques tels que la toux, le flux urinaire, les mouvements péristaltiques de l'intestin.

Bien que les travaux concernant ce problème soient en pleine évolution, on peut, dès à présent, distinguer plusieurs catégories de structures de surface intervenant dans ce phénomène d'adhésion :

– les *fimbriae* (de type 1) ou *pili* des *Enterobacteriaceae* : de nature filamenteuse, codés par un locus chromosomique, ils donnent aux bactéries observées en microscopie électronique un aspect « en hérisson ». Les *fimbriae* de type 1, de nature protéique, confèrent aux bactéries la capacité d'agglutiner une large variété de globules rouges (cobaye, poule, cheval, etc.). Cette hémagglutination est inhibée par le mannose. Les molécules responsables de cet attachement appartiendraient à la grande famille des lectines (sucres) leur permettant de se fixer aux récepteurs présents à la surface des cellules hôtes ;

– des antigènes d'adhésion, ou adhésines codées par des plasmides : de nature protéique également, ils correspondent à des *fimbriae* d'un autre type (*fimbriae like*). Ils adhèrent aux cellules intestinales et ont aussi des propriétés hémagglutinantes, mais celles-ci ne sont pas inhibées par le mannose. Ces antigènes de surface (antigènes K) ont été isolés chez les *E. coli* diarrhéogènes de l'homme et de l'animal et ils sont considérés comme l'un des facteurs responsables de la maladie. Quatre antigènes de ce type sont actuellement bien connus :

- K_{88} chez les *E. coli* entéropathogènes du porcelet ;
- K_{99} chez les *E. coli* entéropathogènes du veau et du mouton
- CF_{AI} et CF_{AII} chez les *E. coli* entéropathogènes humains.

– le glycocalyx (*fig. VII.5*) : il est constitué de longues fibres polysaccharidiques qui adhèrent aux surfaces des cellules humaines ou s'enchevêtrent aux polysaccharides des cellules réceptrices. Contrairement aux antigènes précédents, ils ne se développent pas dans les milieux de culture *in vitro*. La quasi-totalité des espèces pathogènes se fixe sur les cellules épithéliales des muqueuses de la gencive dans le cas de *Str. mutans* et *Str. sali-*

Copyrighted material

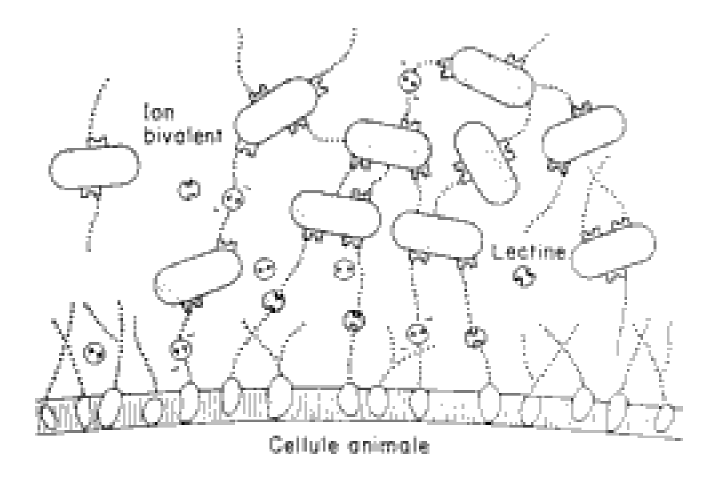


Figure VII.5 – **Le glycocalyx.**

Les bactéries et la cellule animale sont entourées de fibres polysaccharidiques ramifiées et reliées aux glycoprotéines membranaires. Les sous-unités osidiques terminales peuvent interagir par des forces d'attraction de type polaire, les glucides chargés négativement sont reliés par des ions positifs bivalents (Mg^{++}). Une liaison peut aussi se faire par l'intermédiaire d'une lectine ; cette dernière interaction est spécifique : les bactéries dont les polysaccharides sont différents n'adhèrent pas *(d'après Pour la science...).*

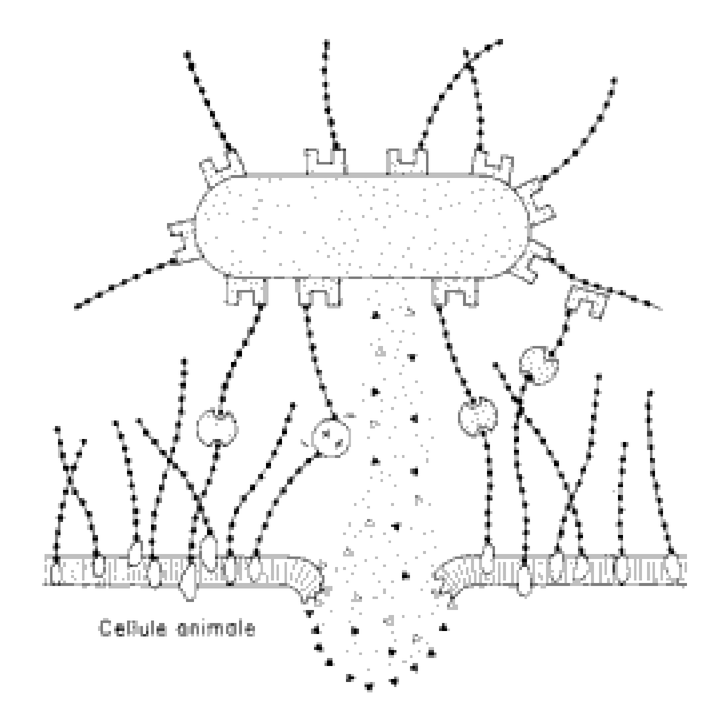


Figure VII.6 – **Modèle d'infection bactérienne.**

L'infection débute par la fixation de la bactérie sur la cellule animale. Les fibres de glycocalyx déterminent un environnement où les toxines et les enzymes bactériennes (points noirs) diffusent, détruisent la membrane cellulaire, et digèrent le contenu cytoplasmique. Les nutriments libérés (ronds blancs) sont repris par le métabolisme bactérien *(d'après Pour la science...).*

varius, du jéjunum, du duodénum ou de l'iléon avec *E. coli, V. cholerae* et les *Salmonella,* du côlon avec les *Clostridium* et les *Shigella.* La pathogénicité de ces souches dépend de leur aptitude à se maintenir au contact de l'épithélium pour ensuite proliférer *(fig. VII.6).*

3.3.1.2. Résistance à la phagocytose

Le rôle des capsules est bien connu : les pneumocoques encapsulés (type S), injectés par voie intrapéritonéale à la souris, tuent l'animal en 24 heures ; les pneumocoques sans capsules (type R) en sont incapables.

D'autres bactéries (mycobactéries, *Brucella, Pasteurella*) ne sont pas détruites après englobement par les cellules phagocytaires qui ne possèdent pas l'équipement enzymatique nécessaire. Dans la tuberculose, les bacilles seront transportés par les macrophages à l'intérieur desquels ils peuvent se multiplier.

3.3.1.3. Production d'enzymes

Une bactérie virulente possède le plus souvent un équipement enzymatique lui permettant l'envahissement des tissus. L'exemple du staphylocoque est démonstratif à cet égard. Cette bactérie produit en effet de nombreuses enzymes dont l'activité favorise l'extension du foyer infectieux :

– la coagulase qui entraîne la formation d'un caillot endoveineux protégeant le germe de la phagocytose et induisant la pullulation microbienne ;

– la fibrinolysine qui contribue à la dislocation du caillot et à la libération puis à la dissémination des germes ;

– la hyaluronidase, ou facteur de diffusion, qui hydrolyse l'acide hyaluronique, constituant de la substance fondamentale du tissu conjonctif ;

– la désoxyribonucléase qui hydrolyse l'acide désoxyribonucléique et qui intervient dans la formation de lésions tissulaires.

3.3.1.4. Multiplication

Expérimentalement, l'inoculation de bactéries virulentes chez un animal sensible donne lieu à une multiplication rapide non seulement au point d'injection mais aussi dans le sang et dans tous les organes. Ce pouvoir de diffusion est bien établi avec des espèces comme le pneumocoque ou le bacille du charbon.

Copyrighted material

Le phénomène est identique dans les infections humaines bien que les bactéries se multiplient difficilement dans les tissus ou dans le sang. Le taux de croissance *in vivo* est beaucoup plus faible que celui observé *in vitro*. Le pouvoir de multiplication sera finalement la résultante de l'activité bactérienne, de ses facteurs de pathogénicité (par exemple, enzymes) et des réactions de défense de l'hôte. Il sera largement amplifié au cours des infections opportunistes qui se greffent sur des organismes aux défenses diminuées.

3.3.1.5. Évaluation de la virulence

On sait depuis longtemps que l'apparition d'une maladie est conditionnée par la quantité de micro-organismes infectants. Ainsi, quelques bactéries tuberculeuses (de 1 à 10) inhalées suffisent pour provoquer la tuberculose tandis que des populations de *S. typhi* de l'ordre de 10^5 doivent être ingérées pour engendrer la fièvre typhoïde. D'où la notion de doses infectieuses qu'il est difficile évidemment d'établir chez l'homme.

Il est en revanche possible de faire des évaluations précises chez l'animal en définissant, par exemple, la dose létale 100, c'est-à-dire la quantité de bactéries entraînant la mort de 100 % des animaux infectés. Cependant, comme cette dose peut varier selon les animaux et les conditions expérimentales, on recherche plus communément, pour atténuer ce facteur d'incertitude, la DL 50 qui entraîne la mort de 50 % des animaux infectés.

Il faut être très réservé sur l'interprétation de ces données car, en effet, les résultats observés seront valables pour une souche donnée, pour un mode d'introduction choisi (sous-cutané, intramusculaire, intrapéritonéal, oral, etc.) et chez un hôte défini. On sait par exemple que certaines lignées de souris sont beaucoup plus sensibles que d'autres à l'infection tuberculeuse. Par ailleurs, ces notions de type expérimental ne peuvent être transposées à l'homme.

3.3.2. Variations de la virulence

3.3.2.1. Atténuation de la virulence

Les souches virulentes tendent à perdre cette capacité dès qu'elles sont isolées de l'organisme malade. La virulence s'atténue et même disparaît au cours des passages successifs de la bactérie sur des milieux de culture artificiels. C'est de cette observation faite par Pasteur qu'est née la vaccination.

Dans le choléra des poules (septicémie hémorragique foudroyante), la souche est atténuée par plusieurs repiquages espacés de plusieurs mois. Dans le charbon, la « bactéridie », maintenue à la température de 42 à 43 °C, devenait incapable de sporuler et perdait progressivement sa virulence. Avec la rage, la suspension vaccinale provenait de moelle épinière de lapins tués par le « virus fixe » (de virulence constante) puis desséchée à l'air pendant plusieurs semaines. Le vaccin antituberculeux BCG, du nom de ses auteurs (Calmette et Guérin), est préparé à partir d'une souche d'un bacille tuberculeux bovin vivant dont la virulence a disparu après 230 repiquages successifs sur pomme de terre biliée glycérinée.

3.3.2.2. Exaltation de la virulence

Inversement, pour retrouver ou exalter la virulence, il est possible de pratiquer des passages répétés sur l'animal qui va sélectionner les bactéries les plus virulentes. L'extension de l'infection au cours des épidémies est due à la transmission de l'agent pathogène d'un individu à un autre individu et au maintien ou à l'augmentation de virulence des souches sélectionnées à travers ces transferts. Les infections iatrogènes qui se diffusent dans les services hospitaliers en sont d'autres exemples. Ici, le malade, souvent immunodéprimé, constitue un terrain particulièrement réceptif.

3.3.2.3. Conservation de la virulence

On peut conserver la virulence des souches microbiennes par inoculation à l'animal puis passages successifs, en respectant des durées calculées expérimentalement. Actuellement, on procède plus simplement par congélation à – 70 °C (ou dans l'azote liquide) ou par lyophilisation (sublimation sous vide à basse température).

3.3.3. Facteurs liés à l'hôte

La virulence d'un agent pathogène est différente selon l'organisme auquel il est inoculé. Il existe

Copyrighted material

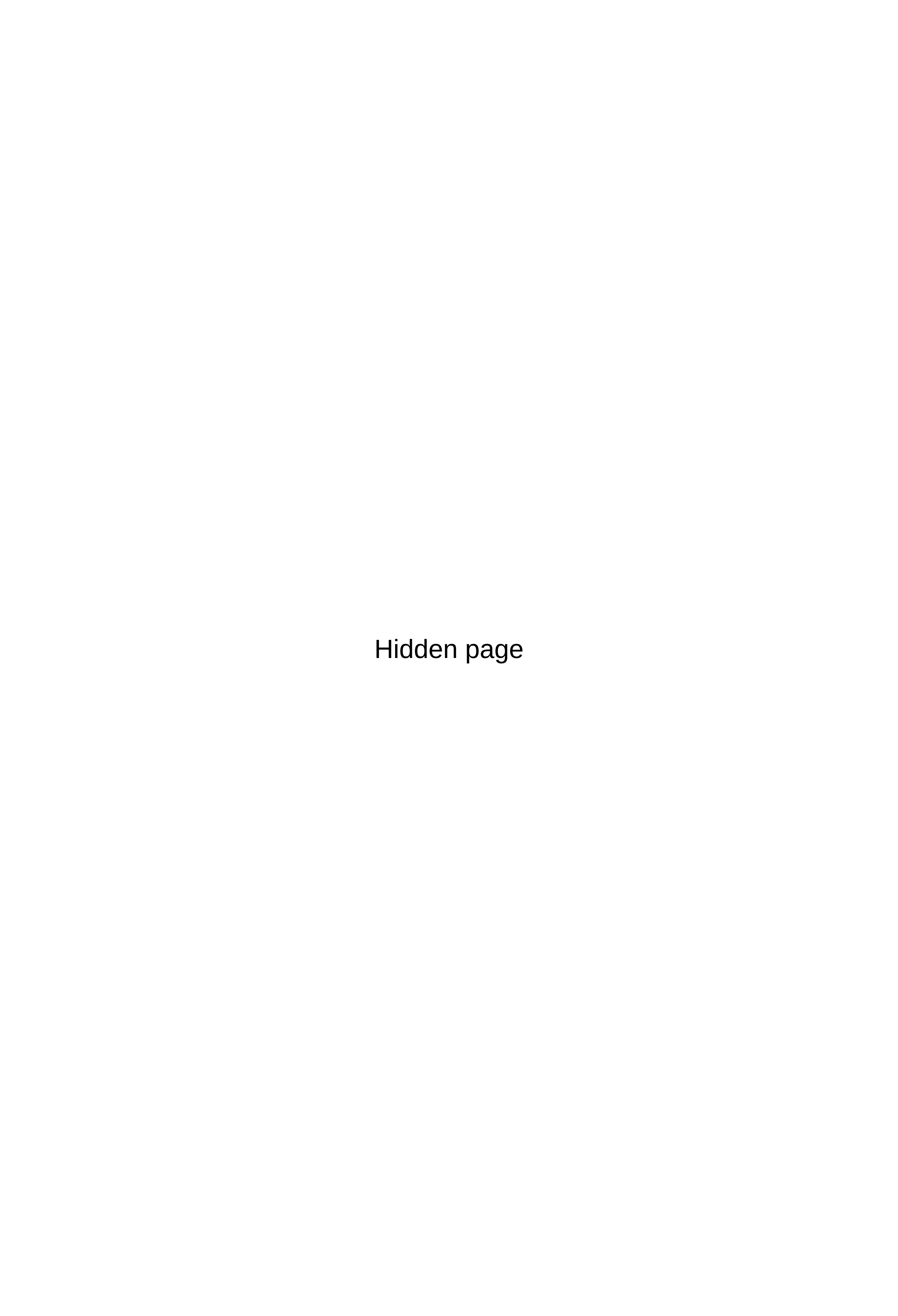

Hidden page

Tableau VII.4 – Principales toxines bactériennes.

Sites de toxinogénèse	Bactéries toxinogènes	Principales toxines	Toxines annexes et enzymes hydrolytiques
Production de toxines dans l'aliment	- *St. aureus* - *Cl. botulinum*	- Enterotoxines - Toxines botuliques	 - Hémolysine
Colonisation du contenu intestinal	- *B. cereus* - *Cl. botulinum* - *Cl. difficile* - *Cl. perfringens*	- Hémolysine BL, céréolysine - Toxine botulique - Toxines A et B - Enterotoxine, toxines β, ε	 - Hémolysine - Collagénase - Perfringolysine, protéases
Colonisation de la muqueuse respiratoire	- *Bordetella pertussis* - *C. diphteriae* - *Ps. aeruginosa* - *Str. pneumoniae*	- Toxine pertussis, adénylcyclase - Toxine diphtérique - Exotoxine A, S - Pneumolysine	- Cytotoxine - Protéase, neuraminidase
Colonisation de la muqueuse digestive	- *E. coli* enterotoxinogène - *E. coli* nécrotique - *V. cholerae* - *Shigella* - *Y. enterocolitica*	- Entérotoxines LT, ST - Toxine nécrosante (CNF), CDT - Toxine cholérique, entérotoxine Zot, Ace Shiga toxine - Entérotoxine ST	- Hémolysine - Neuraminidase, protéase
Colonisation de la muqueuse urinaire	- *E. coli*	- Vero toxine	
Colonisation de plaie et d'abcès	- *Cl. tetani* - *Cl. perfringens* - *St. aureus* - *Str. pyogenes* - *Ps. aeruginosa*	- Toxine tétanique - Toxines α, θ - TSST, hémolysine α - TSLS, toxines érythrogéniques, streptolysine - Exotoxines A, S	- Hémolysine - Protéases, hyaluronidase - Exofoliatines, leukocidines - Protéases, protéines M - Protéases, neuraminidases, phospholipases
Septicémie	- *Bacillus anthracis*	- Toxines EF, LF	

celles de *Sh. dysenteriae*, de *Bordetella pertussis* et d'*E. coli* (entérotoxine), le sont par des bacilles à Gram négatif.

Il est possible de les classer par référence à leur localisation ou leurs propriétés pharmacologiques, ou encore leur site d'action dans la cellule. Nous adopterons la première de ces éventualités.

3.4.1.1.1. Classification topologique

On distingue dans ces conditions trois types de toxines.

– les **exotoxines vraies**, qui sont excrétées dans le milieu extracellulaire immédiatement après leur synthèse, sans aucune altération des structures ni du fonctionnement de la cellule. Cette situation est davantage caractéristique des bactéries à Gram positif. Ainsi, la toxine diphtérique, la toxine staphylococcique et la toxine de *Cl. perfringens* sont sécrétées à 95 % dans le milieu au cours de la phase exponentielle de croissance, alors que la concentration endocellulaire, sans être nulle, est minime *(fig. VII.7a)*. On les retrouve dans les filtrats de culture ;

– les **toxines à localisation mixte endocellulaire et exocellulaire**, comme la toxine tétanique et la toxine botulinique, qui sont libérées en partie dans le milieu pendant la phase exponentielle de croissance. Une partie plus ou moins importante reste endocellulaire et n'est libérée qu'après l'autolyse des bactéries *(fig. VII.7b)* ;

Copyrighted material

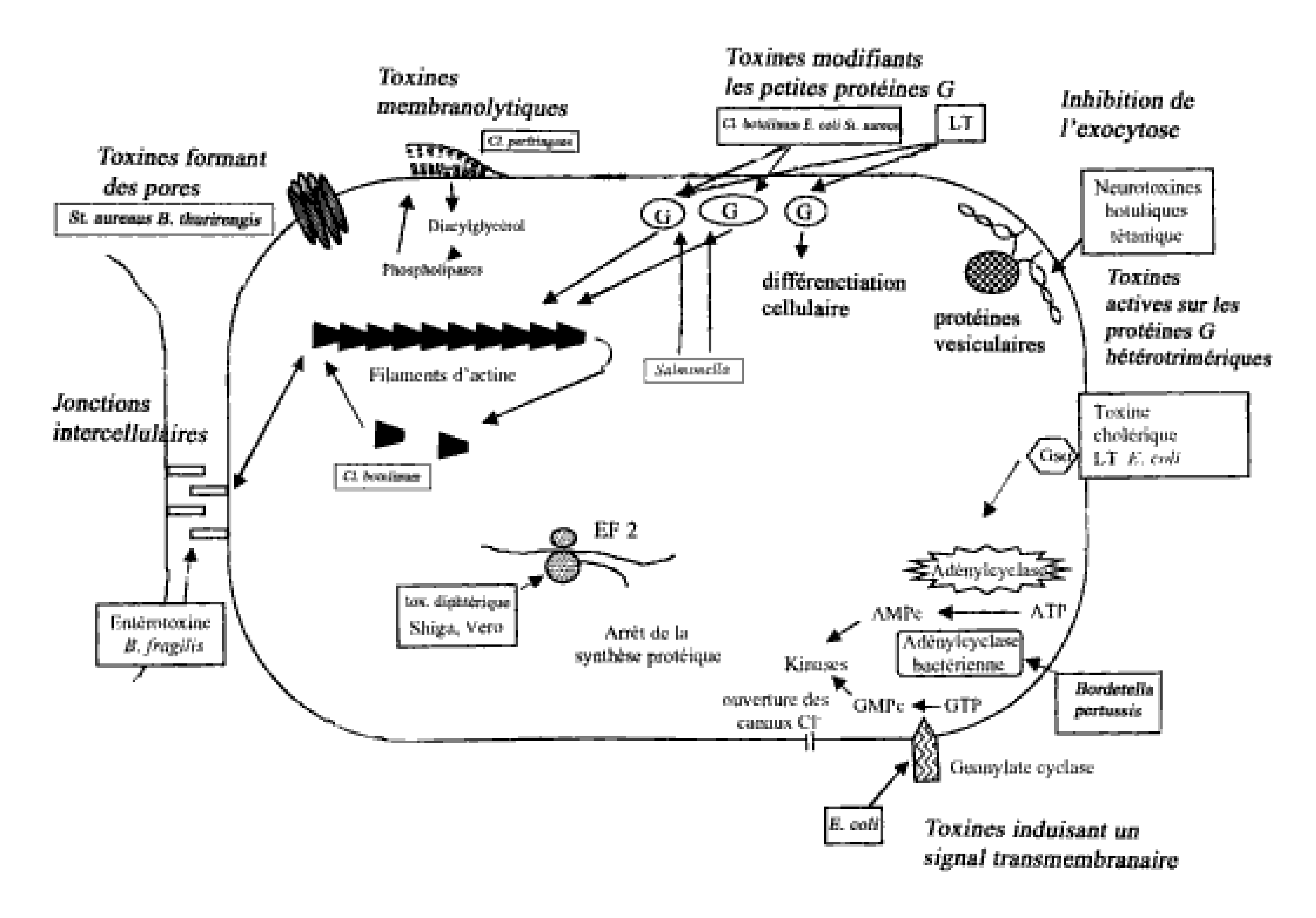


Figure VII.8 – **Schéma des principaux modes d'action des toxines sur les cellules eucaryotes.**
(D'après R. Popoff Bull. SFM 15 (2) 2000).

cependant constituée par des molécules « liant le cholestérol » telles la streptolysine O (SLO)de *Str. pyogenes*, la céréolysine O (CLO) de *B. cereus,* la tétanolysine (TTL) de *Cl. tetani* la perfringolysine de *Cl. Prefringens* (*fig. VII.9*). Cette liaison active les oligomères et permet ainsi la formation des pores.

D'autres agissent en ayant pour cible les phospholipides membranaires. C'est le cas de la toxine α de *Cl. perfringens,* à la fois phospholipase C et sphingomyélinase, qui provoque le clivage des bicouches lipidiques induisant ainsi une déstabilisation des membranes. De plus, certains produits de ce clivage (tel l'inositol-3-phosphate) ont une activité de second messager qui vient perturber le métabolisme cellulaire et, en particulier, activer les phospholipases endogènes.

• **Toxines modifiant un signal membranaire**. Elles reconnaissent un récepteur spécifique et l'activent pour entraîner un signal de type hormonal. Un exemple en est donné par la toxine thermostable (Sta) d'*E. coli.* Possédant 3 ponts disulfure intramoléculaires lui assurant sa grande stabilité, cette toxine reconnaît comme récepteur la guanylate cyclase du côté apical des entérocytes. Cette enzyme est alors activée en permanence, ce qui provoque une augmentation importante de GMP cyclique qui stimule les canaux Cℓ, d'où une sécrétion accrue de Cℓ, d'eau et d'autres électrolytes conduisant au syndrome diarrhéique.

• **Toxines modifiant une cible protéique membranaire**. Certaines souches de *Bacteroides fragilis* sécrètent une entérotoxine qui est une métalloprotéase. Elle agit en se fixant sur le domaine extracellulaire de la cadhérine E, protéine impliquée dans les jonctions intercellulaires. Il s'ensuit des modifications du cytosquelette et, notamment, une disparition des grandes fibres d'actine, ce qui a pour conséquence une ouverture des jonctions intercellulaires.

Copyrighted material

bien dans un produit biologique (sérum, vomissements, matières fécales, contenu gastrique ou intestinal). Conformément au protocole défini dans le *tableau VII.8*, si une toxine botulinique est présente, tous les animaux meurent sauf ceux qui sont protégés par le sérum spécifique.

Il est possible, en utilisant un poids connu d'un produit et un volume connu de diluant, de préciser le titre en toxine du produit examiné, les résultats étant exprimés en DMM par gramme de produit, (aliment, agent infectieux atténué ou de ses antigènes).

Tableau VII.8 – **Identification d'une toxine botulinique à partir d'un aliment par toxinotypie.**

– 10 g d'aliment broyé
  + diluant phosphaté mesuré (entre 20 et 30 ml).
– Contact 10 minutes.
– Centrifugation.
– Surnageant réparti en 6 tubes à raison de 2 ml par tube
  + 0,1 ml sérum antibotulinique.

Tube N°	1	2	3	4	5	6
Sérum antibotulique de type	A	B	C	D	E	Témoin

– Incuber 30 minutes à 37 °C.
– Inoculer 2 souris par tube
  (1 ml voie intrapéritonéales).
– Observer les animaux durant 48 heures.
– Les animaux sont protégés par les sérums spécifiques du type en cause.

3.4.4. Mycotoxines

3.4.4.1. *Structure et genèse*

Les mycotoxines sont des molécules produites dans les aliments par des moisissures et capables d'effets toxiques. On connaît actuellement une centaine de mycotoxines produites par environ 200 espèces de moisissures *(tab. VII.9)*.

Le groupe principal est constitué par les « aflatoxines » *(fig. VII.10)*. La contamination du lait par l'aflatoxine M_1 a été mise en évidence dès 1960. La contamination suit la chaîne alimentaire depuis le végétal (céréales) contaminé, par *Aspergillus flavus* notamment, jusqu'au produit laitier (fromage ou autre) en passant par l'animal. Les aflatoxines végétales (B_1, B_2, G_1 ou G_2) sont partiellement métabolisées chez l'animal en leurs dérivés hydroxylés (M_1, M_2, M_4, P_1, aflatoxicol et Q_1). On a pu déterminer que pour une vache consommant par jour 6 kg de fourrage contaminé par de l'aflatoxine B_1 à raison de 10 $\mu g \cdot kg^{-1}$, on peut s'attendre à une excrétion de 0,02 à 0,07 $\mu g \cdot L^{-1}$ d'aflatoxine M_1 dans le lait en supposant la production journalière de lait à 20 litres. Plus simplement, il faut considérer que de 1 à 3 % de l'aflatoxine B_1 est transformée en aflatoxine M_1, ce qui a conduit le législateur à limiter le teneur de l'aliment du bétail en alflatoxine B_1 à 0,005 $mg \cdot kg^{-1}$. Les étapes de transformation du lait (réfrigération, pasteurisation, écrémage, caillage, égouttage et salage) ne détruisent pas l'aflatoxine M_1. Il semblerait que celle-ci établisse des liaisons avec la caséine du lait.

Les fromages peuvent aussi être contaminés directement par la présence de souches toxigènes dans les moisissures d'ensemencement ou par invasion de moisissures ambiantes. Les moisissures utilisées en fromagerie (*Pe. camembertii* et *Pe. roquefortii*…) sont tout à fait capables de produire des mycotoxines (acide cyclopiazonique, acide pénicillique…). En règle générale, ce risque est minime car les souches utilisées ont été sélectionnées comme non productrices. De plus, elles sont caractérisées par leur faible toxicité, leur instabilité et, si elles sont produites, elles seront surtout localisées au niveau de la croûte. Les contaminations accidentelles lors de la « vie » du fromage (fabrication, manipulation, découpe…) restent bien plus fréquentes et plus dangereuses.

3.4.4.2. *Risques toxiques*

Les aflatoxines s'avèrent être des substances très dangereuses. Ainsi l'aflatoxine B_1 est l'un des plus puissants cancérigènes connus provoquant des hépatomes primitifs. Expérimentalement, on a montré que des rats soumis à des régimes ne contenant que quelques ppb de cette toxine (dose cumulée de 0,5 $mg \cdot kg^{-1}$) développaient des tumeurs. De multiples effets ont été constatés : mutagenèse, tératogenèse, immunosuppression, allergie, nécrose, neurotoxicité, néphrotoxicité… Ces « mycotoxinoses » peuvent être responsables

Copyrighted material

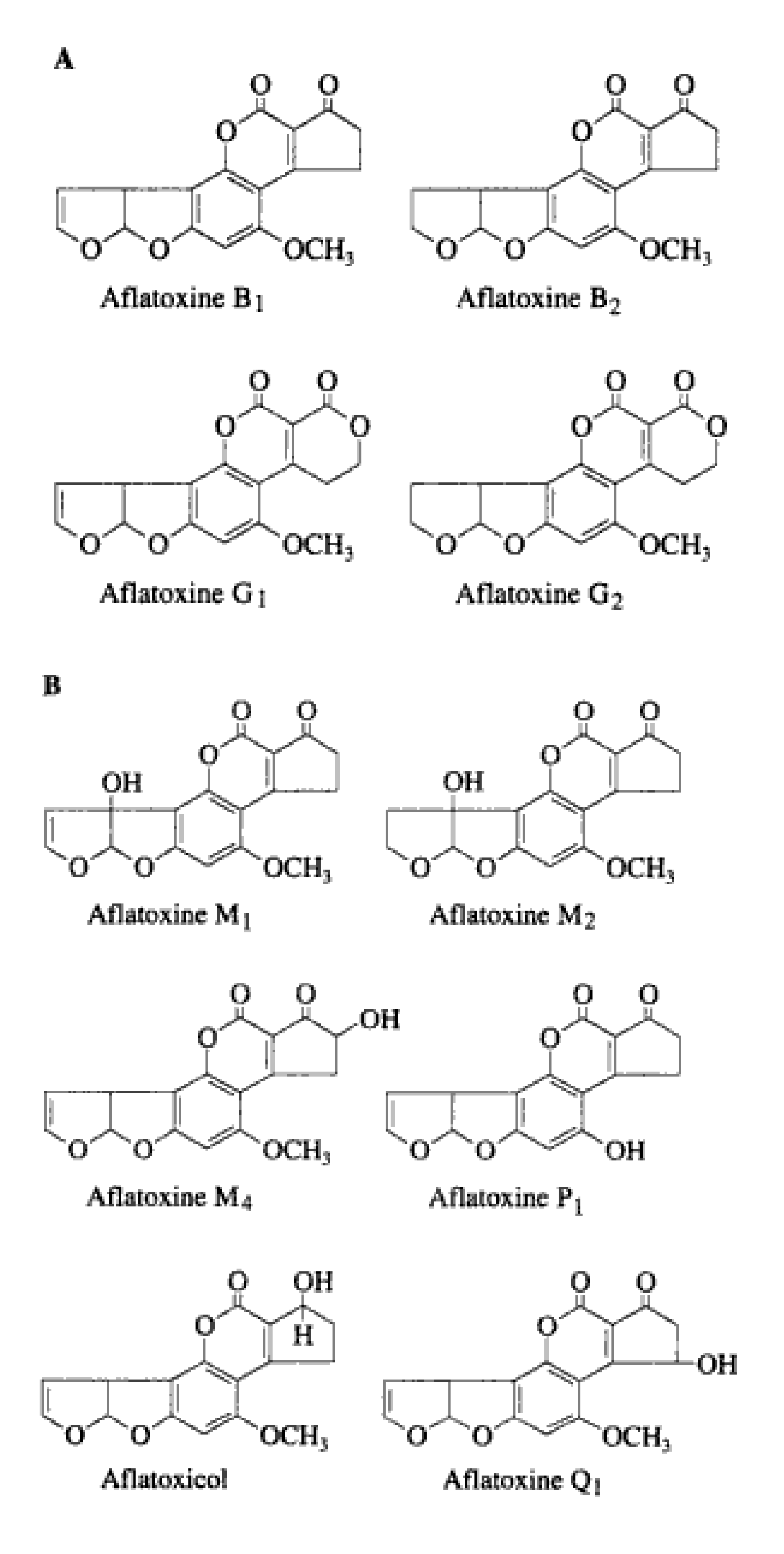


Figure VII.10 – A : formules chimiques de aflatoxines présentes dans les végétaux. B : métabolites des aflatoxines chez le bétail laitier.

Copyrighted material

n'ont pas de législation en la matière ou les moyens d'en appliquer une, ce qui explique que la teneur maximale recommandée par le *Codex alimentarius* soit à 0,5 μg·L^{-1}. Ces réglementations ne concernent que le lait et pas ses dérivés.

3.5. Mécanismes de défense de l'hôte

L'organisme ne reste pas passif devant l'agression microbienne. Dans la plupart des cas, il s'oppose à la pénétration et à l'envahissement microbien des tissus en mettant en jeu divers moyens de défense.

Les premiers sont **non spécifiques**, c'est-à-dire qu'ils interviennent dans tous les cas quel que soit l'agresseur. Ils empêchent la pénétration puis la diffusion des microbes. Ils constituent ce que l'on appelle communément la **résistance naturelle** ou l'**immunité naturelle**.

Les seconds sont **spécifiques** et impliquent des contacts intimes entre l'antigène microbien et les cellules du système immunitaire de l'organisme. Cette reconnaissance mettra en jeu plusieurs types de cellules, les lymphocytes B et les lymphocytes T, dont l'activité contribuera à détruire les micro-organismes et à assurer la guérison.

3.5.1. Mécanismes non spécifiques

3.5.1.1. Barrière cutanéo-muqueuse

La peau offre une certaine résistance à l'infection. De par sa structure de tissu épithélial, grâce aux couches de cellules kératinisées, à leur renouvellement permanent par desquamation et à l'élimination mécanique de toutes les particules adhérentes, elle joue un premier rôle de barrière passive. Les sécrétions sébacées (acides gras) et sudoripares (acide lactique) ont un effet bactéricide qui complète efficacement l'effet mécanique. Enfin, les bactéries commensales de la peau, ou **résidantes**, adaptées à leur habitat, empêchent l'implantation d'autres espèces pathogènes spécifiques ou opportunistes. De plus, des études récentes ont montré que la peau jouait un véritable rôle immunitaire notamment dans la maturation des lymphocytes T.

Les **muqueuses**, en parfaite continuité avec le revêtement cutané, peuvent être d'autres lieux de pénétration. La muqueuse respiratoire, grâce aux cellules ciliées et aux cellules à mucus, assure l'englobement et l'élimination de 90 % des particules inhalées. Le péristaltisme intestinal, le flux urinaire, l'écoulement des larmes sont autant de moyens physiques inhibant l'adhérence des micro-organismes aux muqueuses.

Sur le plan chimique, on peut évoquer le **pH gastrique** qui stérilise le contenu stomacal, le lysozyme des sécrétions nasales, lacrymales, salivaires et intestinales qui détruit le peptidoglycane de la paroi bactérienne.

Par ailleurs, les flores commensales naturelles de ces muqueuses assurent le maintien d'un équilibre et empêchent toute pénétration et pullulation d'espèces étrangères. Toute modification de cet équilibre, en particulier par les antibiotiques, entraîne un dysmicrobisme et la prolifération d'espèces pathogènes. Dans la flore intestinale de l'homme par exemple, les bactéries anaérobies strictes qui prédominent (10^{11} bactéries·g^{-1}) jouent un rôle protecteur bien connu qu'on appelle **effet de barrière**.

3.5.1.2. Réaction inflammatoire

La peau ou les muqueuses peuvent être franchies à la suite de lésions plus ou moins profondes : excoriations, piqûres, brûlures, plaies, etc. Les bactéries parviennent alors dans le tissu conjonctif et induisent une série de réactions physiopathologiques au niveau cellulaire et tissulaire dont l'ensemble constitue la réaction inflammatoire. Ce processus, connu depuis le milieu du XVIIIe siècle, est caractérisé par quatre symptômes : la **rougeur**, la **chaleur**, la **douleur** et l'**induration**.

La réaction inflammatoire débute avec l'agression des cellules des tissus à la suite, par exemple, d'une plaie. L'altération de tout vaisseau sanguin entraîne le déclenchement du mécanisme de coagulation dont les principaux facteurs vont activer la réaction inflammatoire (facteur XII activant la production de kinines et l'adhésion des leucocytes ; thrombine favorisant la libération de sérotonine par les plaquettes ; fibrine à effet chimiotactique sur les leucocytes).

La libération de **médiateurs chimiques** (histamine, bradykinine), due aux altérations cellulaires

Copyrighted material

par les bactéries, produit ensuite une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire des tissus régionaux, d'où la rougeur et la sensation de chaleur *(fig. VII.11a)*.

Le foyer infectieux est l'objet d'un afflux leucocytaire. Après avoir adhéré aux parois vasculaires des vaisseaux capillaires, les leucocytes du sang (surtout les polynucléaires) migrent à travers les parois : c'est la diapédèse. La mobilisation des leucocytes se fait sous l'influence de facteurs chimiotactiques d'origine microbienne (polysaccharides), leucocytaire ou sérique (complément) et de médiateurs (kinines). Les endotoxines exercent un effet inverse (chimiotactisme négatif) *(fig. VII.11b)*. Il faut noter qu'à ces phénomènes s'ajoute une importante fuite des protéines plasmatiques conduisant à un œdème qui peut occasionner des désordres physiologiques supplémentaires.

Ce conflit cellulaire et tissulaire, limité par une barrière de fibrine, donne naissance à un **foyer purulent** constitué de leucocytes mêlés aux tissus nécrosés. La sensation de douleur est due à l'excitation des terminaisons nerveuses loco-régionales *(fig. VII.11c)*.

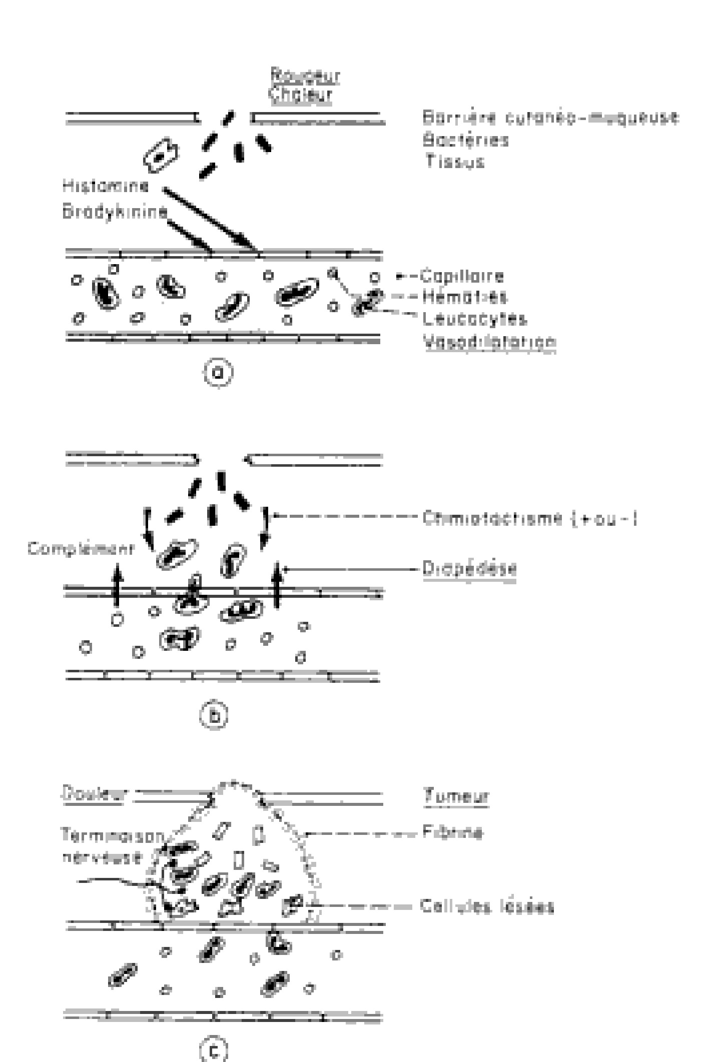


Figure VII.11 – **Réaction inflammatoire.**

a : vasodilatation, rougeur, chaleur ;
b : diapédèse ;
c : tumeur, douleur.

3.5.1.3. Phagocytose

La réaction inflammatoire assure la mobilisation spécifique ou non spécifique des cellules phagocytaires. Elle constitue donc une étape indispensable à la phagocytose, étape ultime du processus de défense qui tend à la destruction de l'agresseur.

Les cellules phagocytaires comprennent, d'une part et en priorité, les **polynucléaires neutrophiles** et, d'autre part, les **monocytes** sanguins et les **macrophages** tissulaires du système réticulo-histiocytaire (macrophages alvéolaires du poumon, cellules de Kupffer du foie, macrophages de la rate et des ganglions lymphatiques).

Le phénomène de phagocytose comprend plusieurs phases *(fig. VII.12)*.

• **Phase d'adhésion**. À l'origine de cette étape, plusieurs facteurs complexes : attraction cellulaire liée aux charges électriques membranaires, facteurs extracellulaires (complément, opsonines). Les cellules phagocytaires émettent des pseudopodes (leucocytes) ou des voiles cytoplasmiques (macrophages) qui assurent le contact avec les particules à ingérer. Le rôle du chimiotactisme et de l'immuno-adhérence est sans doute, ici, prédominant.

• **Phase d'ingestion**. À la suite du contact, les membranes des cellules phagocytaires englobent la particule étrangère, fusionnent autour d'elle et forment finalement une vacuole complètement close ou qui la tient prisonnière. Cette activité est favorisée par le complément et les opsonines.

• **Phase de digestion**. Les **lysosomes** primaires (sacs d'enzymes des granulations) de la cellule phagocytaire migrent puis viennent s'accoler à la vacuole en y déversant leur contenu enzymatique (pour former un **phagolysosome** ou lysosome secondaire). Cette phase est visualisée par le phénomène de dégranulation que l'on peut mettre en évidence au microscope, les lysosomes étant neutrophiles. Le pH interne acide des lysosomes (de

Copyrighted material

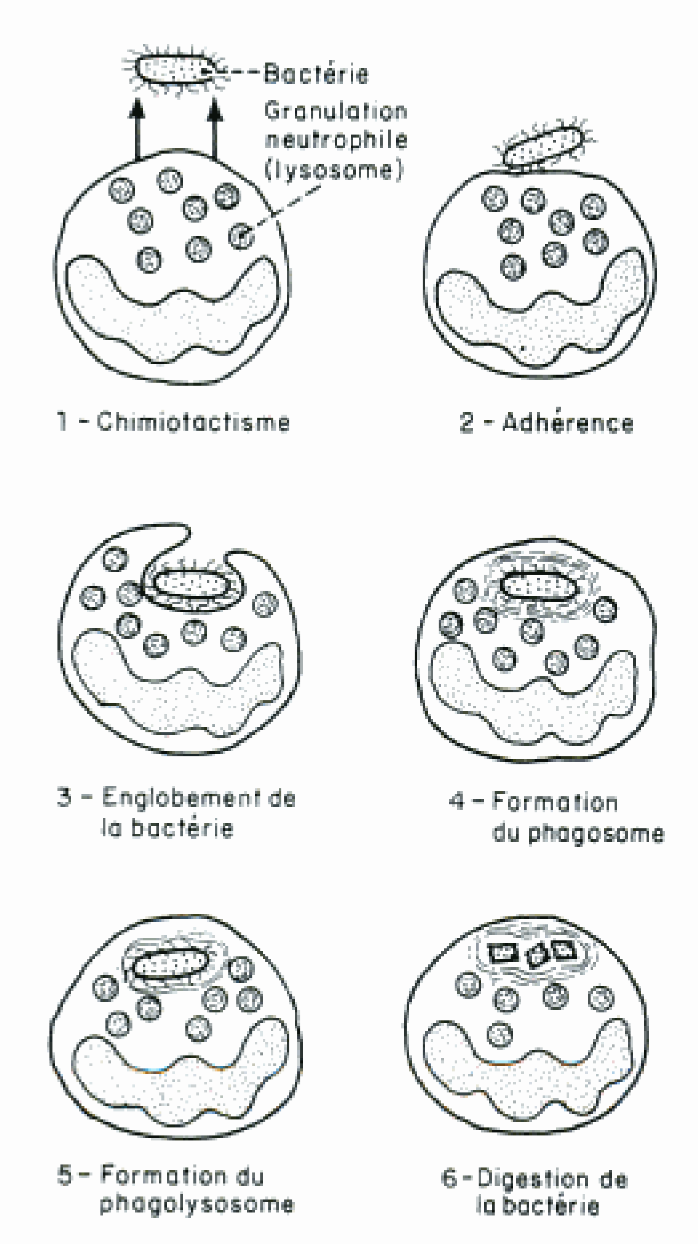


Figure VII.12 – Différentes phases de la phagocytose d'une bactérie par un polynucléaire.

3,5 à 4,5) joue un rôle déterminant dans la rupture des membranes lysosomiales lors de cette étape. Cette phase coïncide avec la mort des bactéries et leur « digestion » enzymatique. En effet, les lysosomes contiennent une grande variété d'enzymes (lysozyme, phosphatase acide, ribonucléase, glucuronidase, galactosidase, lipases etc.) ainsi que d'autres molécules bactéricides non enzymatiques (succinodéshydrogénase, lactoferrine, peroxyde d'hydrogène).

Pendant ce processus, il apparaît une profonde modification du métabolisme de la cellule phagocytaire : augmentation de la consommation d'oxygène, de la glycolyse et du shunt des pentoses. Tout ceci conduit à accroître la production d'ions superoxydes afin de synthétiser le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intervenant dans le pouvoir bactéricide. Par ailleurs, on assiste à l'apparition de protéines cationiques (cathepsine G), détruisant la membrane, et d'enzymes (lysozymes) à spécificité antipariétale.

Dans le meilleur des cas, le processus infectieux est enrayé par destruction et élimination de l'agresseur. Le conflit n'évolue pas toujours aussi favorablement. Certaines thérapeutiques peuvent diminuer le nombre et l'activité des leucocytes ; d'autres inhibent la réaction inflammatoire (glucocorticoïdes). Les germes encapsulés et ceux qui synthétisent des toxines empêchent la phagocytose. Les phagocytes, lorsqu'ils ne disposent pas des enzymes actives nécessaires, englobent l'agent infectieux mais assurent sa persistance, son transport dans les tissus, éventuellement sa multiplication, ce qui aboutit alors à la mort cellulaire. Cette éventualité est le propre des agents infectieux dits intracellulaires comme les mycobactéries, les *Brucella*, les *Listeria*, les *Chlamydia*, etc. Cependant, l'hôte possède des mécanismes de contre-attaque à cette faculté qu'ont certaines bactéries d'échapper à la phagocytose. Des anticorps circulants sont capables de neutraliser les toxines. Une fois complexée à l'anticorps correspondant, la toxine perd sa faculté à diffuser rapidement et devient sensible à la phagocytose. Par ailleurs, des bactéries encapsulées sont aisément « capturées » par les cellules phagocytaires dès lors qu'elles sont recouvertes d'anticorps. Ce phénomène, nommé **opsonisation**, permet une liaison bactérie-phagocyte grâce à des récepteurs spécifiques. Cette possibilité est potentialisée par la présence de certaines fractions du complément (C3b notamment).

Nous avons vu que l'adhérence des microbes aux membranes cellulaires constituait l'étape première de l'infection (voir § 3.3.1.1). Certains anticorps peuvent l'empêcher en recouvrant la cellule microbienne d'anticorps (phénomène de *coating*), comme les immunoglobulines de type IgA.

3.5.2. Mécanismes spécifiques

Ils peuvent être cellulaires ou humoraux. Leur mise en place fait appel à des cellules particulières, les **lymphocytes**, appartenant aux formations lymphoïdes et aux tissus du **système réticulo-histiocytaire** (rate, thymus, moelle osseuse, etc.). Le schéma représenté sur la *figure VII.13* montre la différenciation qui s'opère à partir des cellules souches et qui aboutit aux cellules effectrices. Deux types différents de cellules lymphoïdes sont impliqués dans ces processus de défense :

– les **lymphocytes T (thymodépendants)**, responsables de la réponse cellulaire, activés au contact de l'antigène bactérien, ils libèrent dans le milieu des substances appelées lymphokines qui exercent une activité spécifique sur les cellules effectrices phagocytaires en les mobilisant *in situ* et en induisant un effet cytotoxique ;

Copyrighted material

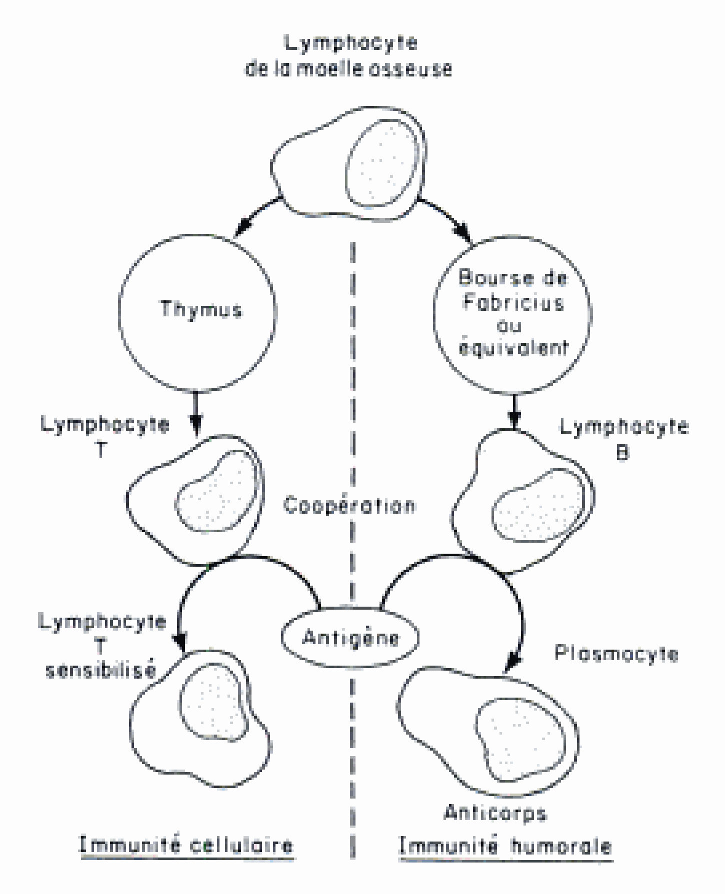


Figure VII.13 – Relations entre les deux types de réaction immunitaire.

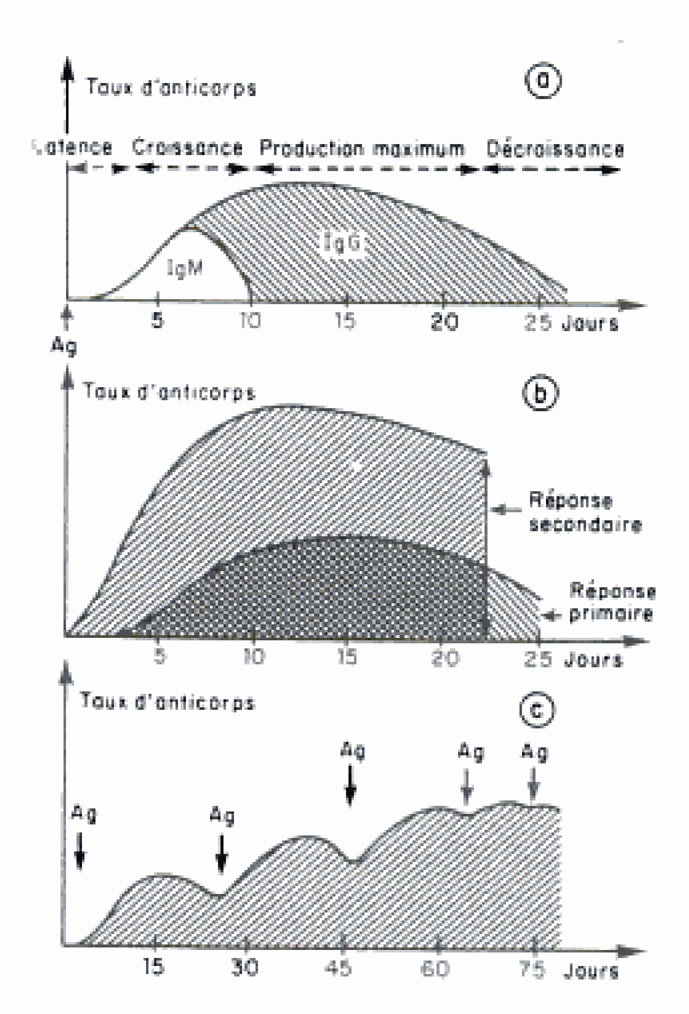


Figure VII.14 – Mode d'apparition des anticorps.

– les **lymphocytes B (bursodépendants)**, qui sont les précurseurs des cellules productrices d'anticorps (**plasmocytes**).

À la suite d'une stimulation primaire d'antigènes, les anticorps produits par les plasmocytes apparaissent en 8 à 10 jours dans le sang. Ce sont les IgM dans un premier temps puis les IgG. En se combinant spécifiquement avec les antigènes, ils neutralisent le pouvoir pathogène de la bactérie en assurant sa destruction puis son élimination. Leur mécanisme d'action est très divers. Certains, les **antitoxines**, neutralisent les exotoxines protéiques ; d'autres **fixent le complément** et induisent la lyse de la cellule sensibilisée ; d'autres encore, les opsonines, facilitent la phagocytose, etc.

L'élaboration des anticorps est modulée en fonction des stimuli *(fig. VII.14)* :

– après un premier contact *(fig. VII.14a)*, on parle de **réponse primaire** ; les anticorps sont décelés à partir du cinquième jour ; leur taux est maximal vers le quinzième jour ;

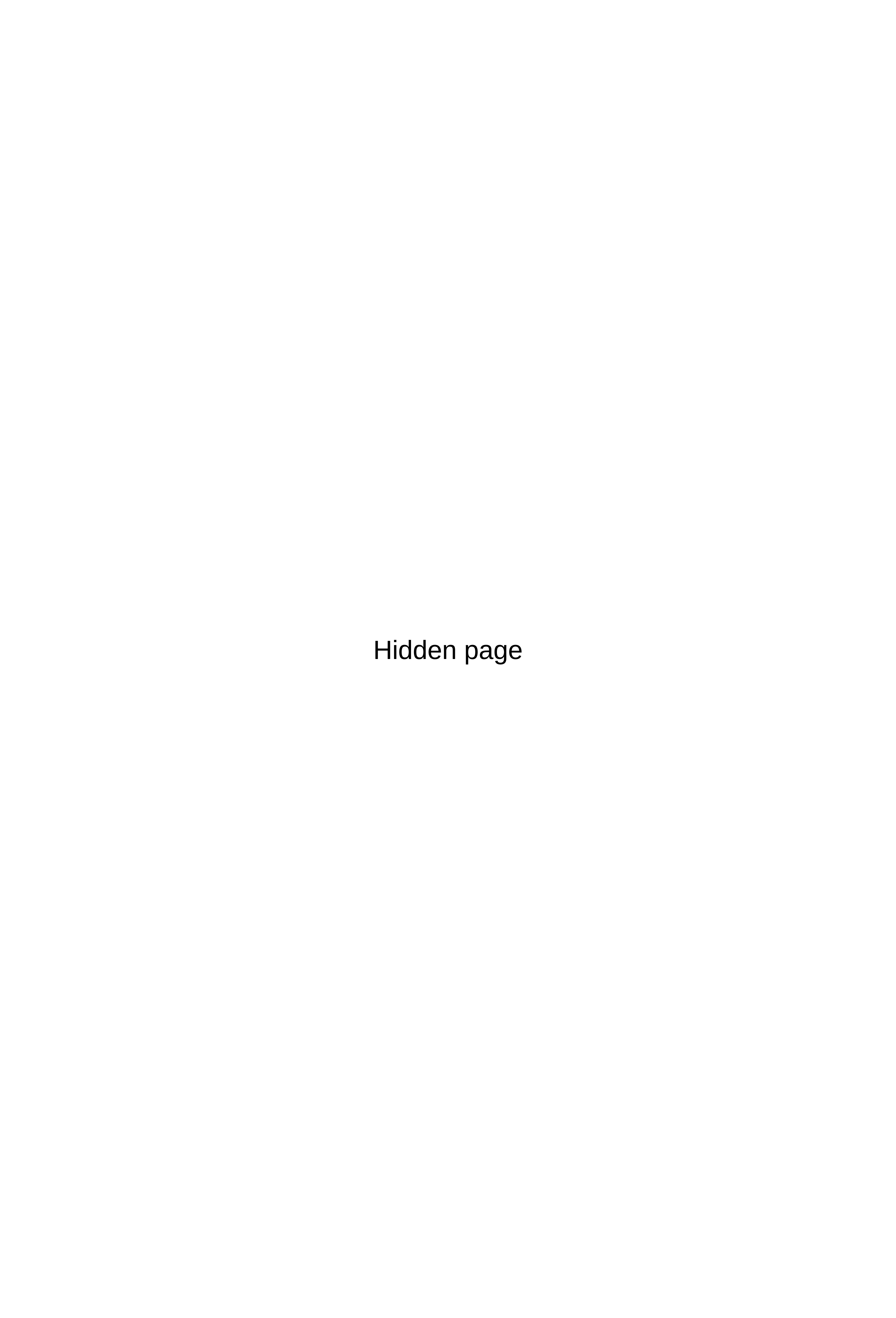
– après un deuxième contact *(fig. VII.14b)*, on dit que la réponse est **secondaire** ; l'augmentation est plus rapide et plus intense ;

– à la suite de stimuli successifs et rapprochés, on obtient dans l'organisme une **hyperimmunisation** ; la réponse est de plus en plus forte mais elle atteint un seuil maximal *(fig. VII.14c)*.

Les réactions immunitaires peuvent être renforcées par différentes substances qu'on appelle des **adjuvants**. Ils sont de nature minérale (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'alumine), bactérienne (BCG) ou huileuse (adjuvant de Freund). Ils retardent la résorption de l'antigène et amplifient la réaction inflammatoire. Inversement, certaines thérapeutiques (corticoïdes, antimitotiques, globulines antilymphocytaires) utilisées en cancérologie ou en transplantation dépriment l'immunité en agissant sur les lymphocytes T. Elles font le jeu des infections opportunistes.

Ainsi, dans la réponse immune, les cellules lymphoïdes B et T sont engagées. La reconnaissance de l'antigène est un événement ponctuel qui doit être amplifié le plus rapidement possible afin que les deux stratégies de défense, anticorps et immunité cellulaire, puissent s'exercer avec effi-

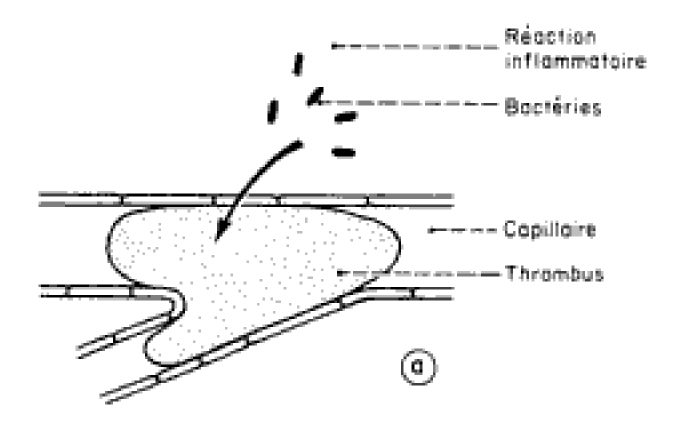
Copyrighted material


Hidden page

microbienne et la colonisation de la paroi veineuse altérée donnent naissance à un caillot veineux adhérent (thrombophlébite) qui, en se fragmentant, libère brutalement et massivement les agents infectieux *(fig. VII.15)*. Ce mécanisme est le propre des septicémies à *Staphylococcus*, à pneumocoques et à *Streptococcus*. Il peut être rencontré avec certaines entérobactéries et des anaérobies.

• **Septicémies à point de départ lymphatique.** L'exemple le plus démonstratif est celui de la fièvre typhoïde. La porte d'entrée est, ici, digestive. Les bacilles typhiques, après ingestion, traversent sans la léser la muqueuse intestinale. Ils sont arrêtés par les ganglions lymphatiques mésentériques dans lesquels ils se multiplient avant d'être déversés avec la lymphe dans le sang circulant. La fièvre typhoïde est donc d'abord une septicémie d'origine lymphatique. L'état septicémique et la libération de l'endotoxine microbienne rendent compte de la symptomatologie : fièvre, splénomégalie, taches rosées lenticulaires, etc. L'action de l'endotoxine sur les centres neurovégétatifs du troisième ventricule explique le tuphos (état de torpeur), le dérèglement thermique, le collapsus cardio-vasculaire.

• **Endocardites.** Les germes, souvent peu virulents, se multiplient dans les végétations endocardiaques pour se disperser ensuite dans la circulation. La greffe initiale survient à partir d'une bactériémie latente d'origine diverse (urinaire, dentaire, pharyngée). L'endocarde, altéré par une maladie antérieure telle que rhumatisme articulaire aigu, athérome, etc., constitue un terrain d'élection pour la multiplication des germes. La faible virulence de ces derniers explique le caractère exceptionnel des foyers suppurés secondaires.



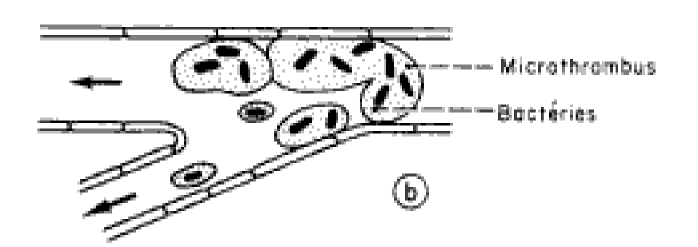


Figure VII.15 – **Septicémie thrombophlébitique.**

a : envahissement des bactéries dans le thrombus ;
b : fragmentation en microthrombus par les enzymes bactériennes et départ vers la circulation.

Certains germes peuvent aussi se greffer sur un endocarde sain, d'où la distinction classique entre les endocardites aiguës à germes pyogènes qui s'implantent sur un endocarde sain et les endocardites subaiguës ou lentes (maladie d'Osler) à *Str. viridans* ou à d'autres germes qui compliquent une cardiopathie préexistante.

3.6.3. Principales infections

3.6.3.1. Infection due à la multiplication des germes

Elle est provoquée par des micro-organismes qui agissent par leur seul pouvoir invasif, comme *Str. pneumoniae*. L'infection à pneumocoque provoque la pneumonie lobaire franche avec fièvre, douleur pleurale aiguë et frissons. Cette pathologie est la conséquence du développement microbien, lui-même dû à la production d'une capsule qui empêche ou retarde la phagocytose. D'autres infections sévères sont dues à un processus de multiplication : le charbon (*B. anthracis*, formes sporulées germinant *in vivo* et se multipliant dans la rate), la peste *(Y. pestis)*, les streptococcies (*Streptococcus* à streptolysines, streptokinases, hyaluronidases…), les méningococcies *(Neisseria méningitidis)*.

3.6.3.2. Infections dues à des toxines

• **Toxi-infection**. La pathologie des infections à caractère toxique est essentiellement liée à la diffusion d'une toxine produite par des micro-organismes se développant dans l'organisme.

Le tétanos en est le cas typique lié à la souillure d'une blessure, souvent minime (écharde), par *Cl. tetani*. Après incubation de 3 à 12 jours apparaissent les premiers signes cliniques (contraction douloureuse permanente des muscles de la motricité). La toxine a été véhiculée par le sang et agit sur les synapses des cellules nerveuses.

Cl. perfringens est l'agent d'une gangrène gazeuse particulièrement sévère. L'infection se déclare soit à la suite de blessures profondes souillées, soit lors de viscérites. L'agent pathogène est à la fois virulent et toxigène. La virulence du germe lui permet de se disséminer dans l'organisme jusqu'au stade de la septicémie de type thromboembolique. De plus, la fermentation des glucides avec production de gaz accélère la nécrose des tissus ce qui favorise la dissémination

Copyrighted material

Tableau VII.11 – Les maladies infectieuses en France en 2000.

maladies	Nombres de cas	décès/an	Porteurs ou infectés
Grippe	8, 8 millions l'hiver 1999-2000 2 millions l'hiver 2000-2001	1 500	
Hépatite B	20 000	1 000	100 000
Tuberculose	6 714	670	
SIDA	1 700	600	22 500 et 24 800
Paludisme (cas importés)	7 127	15 à 20	
Méningites	551	56	
Listériose	220	50	

du germe. La production de toxines comme la toxine, à activité lécithinasique, ou, aux propriétés hémolytiques et nécrosantes, entraîne une toxémie grave.

La diphtérie est un autre cas de toxi-infection qui avait presque totalement disparu dans les pays développés mais qui réapparaît en particulier dans les pays de l'Europe de l'Est. *C. diphteriae* en est l'agent responsable. Son pouvoir est d'élaborer une toxine sécrétée au fur et à mesure de sa formation et qui va bloquer les synthèses protéiques provoquant la mort cellulaire.

• **Intoxination**. L'intoxination peut se définir comme étant une maladie liée à l'ingestion d'une toxine bactérienne. Tous les symptômes sont dus à la toxine sans qu'il y ait besoin de la présence du germe.

Cl. botulinum est le représentant le plus redoutable des intoxinations car le plus souvent mortel. Le botulisme, succédant à l'absorption d'aliments renfermant la toxine élaborée par ce germe (notamment des conserves mal stérilisées et des produits de charcuterie), est caractérisé par des paralysies flasques et des troubles digestifs.

St. aureus producteur d'entérotoxine, est le cas le plus courant, de nos jours, d'intoxication alimentaire, souvent collective. Les staphylocoques entérotoxiques sont souvent présents dans les produits alimentaires en petit nombre et sont sans inconvénients si les aliments sont consommés rapidement ; si les conditions de préparation ou de conservation permettent leur développement pendant quelques heures (rupture de la chaîne du froid), il y a production d'une toxine thermostable ; une cuisson éventuelle détruira les germes sans dénaturer la toxine. Après le repas, la toxine agira sur des récepteurs neurovégétatifs mésentériques, provoquant brutalement, 3 heures plus tard, de violents troubles digestifs qui disparaissent aussi brusquement moins de 24 heures après.

3.6.3.3. *Infections mixtes*

Comme leur nom l'indique, il s'agit d'infections à caractère à la fois invasif et toxigène.

Les **infections staphylococciques** en sont un bon exemple. Élaborant de multiples enzymes (coagulases, fibrinolysines, hyaluronidases, β-lactamases…) leur assurant un pouvoir invasif important, les staphylocoques sont également toxigènes (hémolysines, leucocidines…). Ceci peut conduire à des affections localisées (furoncles, abcès) ou à des infections plus généralisées (septicémies thromboemboliques ou vasculaires, endocardites).

Les **salmonelloses** à *S. typhi* ou *paratyphi* a, b ou c, regroupées sous le nom « fièvres typhoïdes », se caractérisent aussi par ces deux aspects. Provenant généralement d'une eau contaminée, les germes sont ingérés, se multiplient dans l'intestin, traversent la barrière intestinale et gagnent les ganglions lymphatiques mésentériques qu'ils colonisent et, de là, passent dans le sang (pouvoir invasif). À ce niveau, ils élaborent une toxine irritant le système nerveux végétatif (pouvoir toxigène). Tout ceci se matérialise par un état septicémique, des vomissements, des diarrhées, des atteintes du tractus digestif (perforation,

Copyrighted material

hémorragies) et un état de prostration particulier, le « tuphos ».

3.7. Épidémiologie

Les maladies infectieuses ont un comportement bien particulier. Tantôt elles se répandent comme un feu de broussailles dans la population d'une région, d'un pays ou d'un continent, puis régressent et disparaissent. Elles se manifestent sous forme de poussées soudaines et aiguës qu'on appelle **épidémies**. Telles sont celles de peste, de choléra, de typhus qui ont sévi au cours des siècles et qui ont très souvent changé le sort d'une guerre, modifié l'histoire d'un pays. Tantôt, au contraire, une très faible proportion d'individus est atteinte, maintenant en permanence le foyer infectieux. On dit que la maladie est **endémique**, les maladies que l'on contracte dans l'enfance, telles la rougeole, la scarlatine, la coqueluche, etc., en sont des exemples classiques. Tantôt, enfin, la maladie se manifeste sous forme de cas isolés, **sporadiques**.

Pourquoi en est-il ainsi ? Pourquoi, dans certaines circonstances, existe-t-il un équilibre entre l'agent pathogène et une population, et pourquoi, dans d'autres, les individus sont-ils atteints en masse ? Quelles sont ces circonstances ? Une observation attentive des phénomènes montre que l'apparition d'une maladie n'est pas conditionnée uniquement par l'agent infectieux et l'hôte mais aussi par tout un ensemble de circonstances qui tendent à la favoriser ou à l'empêcher.

3.7.1. Mode de transmission

3.7.1.1. Contact direct

Les maladies transmises par contact sexuel (dites maladies sexuellement transmissibles ou MST) sont particulièrement répandues de nos jours. Elles se manifestent sous forme d'ulcérations qui siègent le plus souvent au niveau de l'appareil génital. Il s'agit principalement de la syphilis *(Treponema palidum)* et du chancre mou *(H. ducreyi)*.

Elles s'expriment également par les urétrites qui surviennent quelques jours après le rapport sexuel et qui se caractérisent par un écoulement purulent de l'urètre et des douleurs à la miction, le gonocoque et les *Chlamydiae* en sont les principaux agents responsables.

Dans d'autres cas, le contact est simplement manuel : la tularémie, maladie des rongeurs sauvages et des lièvres, peut être transmise directement au chasseur par le seul contact des mains.

On peut aussi ranger dans cette catégorie les infections consécutives à la souillure d'une plaie. Elles sont bénignes lorsque les microbes introduits sont des saprophytes de la peau. Elles sont au contraire sévères si les plaies sont profondes et si la contamination est déterminée par des *Clostridium* toxigènes (*Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum*, etc.), trouvant un milieu anaérobie idéal à leur développement, ou par *Cl. tetani*, l'agent du tétanos.

La maladie charbonneuse peut être transmise, selon un mécanisme analogue, des animaux infectés à l'homme par contact direct. Au point de pénétration, le plus souvent une coupure ou une érosion cutanée, apparaît une primo-infection ou chancre d'inoculation.

Les larves infestantes de bilharzies (furcocercaires) pénètrent dans l'organisme humain par voie transcutanée lors d'un bain en eau contaminée.

3.7.1.2. Voies respiratoires

Elles jouent un rôle primordial dans la transmission d'un grand nombre de maladies infectieuses. L'homme, en toussant, en éternuant ou tout simplement en parlant, dissémine dans l'atmosphère environnante un nuage de gouttelettes muco-protéiques provenant de ses sécrétions buccales (gouttelettes de Pflugge). Ces gouttelettes contiennent d'innombrables micro-organismes vivants qui vont se maintenir en suspension sur leurs supports protéiniques ou sur les poussières de l'atmosphère. La transmission par les aérosols respiratoires explique l'extrême diffusion d'un grand nombre de maladies : tuberculose, diphtérie, coqueluche, peste pneumonique, méningite cérébro-spinale épidémique, angines, etc. Les infections des voies respiratoires supérieures d'origine virale telles que la grippe ou le banal rhume de cerveau sont transmises de cette manière, de même que les oreillons, la rougeole, la variole, la poliomyélite, etc. On peut y assimiler les contaminations par des spores d'*Aspergillus*, de *Ca. albicans* ou d'autres actinomycètes. En 1976, à Philadelphie, une maladie infectieuse inconnue frappe les participants d'une réunion de vétérans de l'armée américaine. Une nouvelle bactérie, *Legionella pneumophila*, est détectée dans les circuits de climatisation de l'hôtel où a eu lieu la réunion.

D'autres épidémies (rhinites, sinusites, asthme, etc.) ont été décrites à la reprise du travail, soit le lundi soit au retour de vacances. L'origine de ces pathologies provient des climatiseurs et des humidificateurs utilisés dans les locaux professionnels.

3.7.1.3. Voies digestives

Certains micro-organismes contaminent l'individu par voie buccale lorsqu'ils sont ingérés avec l'eau ou les aliments pollués. Tels sont les agents de la fièvre typhoïde, de la dysenterie, du choléra, des intoxications alimentaires, de la distomatose *(Fasciola hepatica)* et l'amibiase *(Entamoeba dysenteriae)*, de l'ascaridiose, du téniasis, du syndrome de *Larva migrans* viscéral, de l'hydatidose et de l'échinococcose, et

Copyrighted mater

population isolée géographiquement, une épidémie de rougeole s'étend progressivement à tous les individus sensibles quel que soit leur âge. L'immunité conférée par la maladie est de très longue durée, elle s'installe dans la population et, à un moment donné, la rend totalement résistante. Le nombre d'individus sensibles est donc nul à cet instant ; il augmente à la suite des naissances jusqu'à ce qu'un nouveau contact, apporté de l'extérieur, déclenche une deuxième épidémie. Celle-ci sera d'autant plus large et plus grave que le temps écoulé sera long. L'épidémie des îles Féroé, au nord de l'Écosse, qui sévit en 1846 en est un exemple démonstratif : tous les individus furent frappés, sauf les sujets âgés qui avaient été atteints de la maladie 60 ans plus tôt. Dans de telles circonstances, la gravité de la maladie est exceptionnellement élevée ainsi qu'en témoigne le taux de mortalité, qui peut atteindre 25 %.

Au contraire, dans la plupart des pays en commerce étroit les uns avec les autres, la rougeole sévit à l'état endémique, réapparaissant tous les ans ou tous les deux ans chez les enfants sensibles, lorsque leur nombre atteint un certain niveau.

La notion d'âge est souvent étroitement en rapport avec l'état d'immunité. L'exemple de la poliomyélite pourra nous en convaincre. Dans les pays où l'hygiène est peu développée, les individus dès leur naissance sont en contact permanent avec les virus responsables. À l'âge de 4 ans, tous ceux qui ont survécu à cette atteinte possèdent une solide immunité. En revanche, dans les pays où l'hygiène et le niveau sanitaire se sont constamment améliorés, les sujets ne subissent pas l'agression continuelle des virus et ne s'immunisent pas. S'ils entrent en contact avec eux au cours de l'enfance, à l'adolescence ou à l'âge adulte, ils font alors la maladie.

Un autre exemple, celui des gastro-entérites infantiles, nous montre encore l'importance du facteur âge. La quasi-totalité des sujets atteints sont des nourrissons de moins de 1 an. Les plus exposés ont de 15 jours à 3 mois. Ici, pourtant, on ne connaît nullement les raisons de cette sensibilité particulière.

3.7.2.2. *Agent infectieux*

On a supposé, durant de longues années, que la progression d'une maladie et son caractère de gravité dépendaient de la virulence de l'agent infectieux. Cette virulence aurait été modifiée, aggravée ou atténuée, selon les contacts de l'agent avec l'hôte. Et l'on a recherché, pour s'en convaincre, des tests de virulence soit *in vitro* soit *in vivo* sur des animaux de laboratoire susceptibles d'établir ce parallélisme. Les résultats ont été très décevants pour la simple raison que le pouvoir pathogène se manifeste sur un terrain, en l'occurrence l'homme, et que vouloir se référer à l'animal, ou plus encore à un test biochimique, pour le définir est une attitude *a priori* critiquable.

En revanche, une notion est claire : celle de la grande mutabilité de certains agents infectieux. Elle joue un rôle primordial dans l'éclosion et l'évolution d'une épidémie. L'exemple de la grippe est, à cet égard, significatif. Depuis 1918, la population mondiale a été successivement atteinte par des virus grippaux de types antigéniques différents, appelés A, Al et A2. Elle a acquis une solide résistance vis-à-vis de chacun d'entre eux car l'immunité conférée par l'infection est spécifique du type antigénique en cause. Il semble donc que le déclenchement d'une épidémie ou d'une pandémie grippale survienne à la suite d'une mutation du virus vers un nouveau type antigénique vis-à-vis duquel la population n'est pas encore immunisée. Ce mécanisme explique la difficulté de mise en œuvre de moyens prophylactiques spécifiques puisque, à chaque occasion, c'est un nouveau type de virus qui est en cause.

3.7.2.3. *Variations géographiques et saisonnières*

Certaines maladies comme la fièvre typhoïde, la tuberculose, la coqueluche, la rougeole, la grippe et la toxoplasmose sont mondialement répandues. D'autres, au contraire, semblent se circonscrire à des foyers géographiques localisés à partir desquels elles essaiment en poussées épidémiques. Le choléra, par exemple, est une maladie essentiellement asiatique, qui a pratiquement disparu du monde occidental depuis 1922 ; elle renaît depuis 1961 (7[e] pandémie) et cherche à s'implanter, de nos jours, au Moyen-Orient et dans une partie du pourtour méditerranéen.

L'infection lépreuse s'étend aux seules zones équatoriales et tropicales. Le trachome, qui attein-

Copyrighted mater

drait plus de 500 millions d'individus, est particulièrement répandu dans les régions chaudes et déshéritées de l'Asie et de l'Afrique. Le paludisme sévit surtout dans les pays pauvres et est particulièrement grave dans les régions tropicales ; l'amibiase se rencontre essentiellement entre le 40° de latitude nord et le 30° de latitude sud. La bilharziose existe à l'état endémique en Afrique et en Amérique du Sud, dans les régions tropicales et équatoriales.

Nombre d'infections se manifestent avec prédilection au cours de certaines saisons. On sait très bien que les maladies dites de l'enfance telles que la scarlatine, la rougeole, la rubéole, la varicelle et la coqueluche surviennent essentiellement pendant l'hiver. La poliomyélite, au contraire, sévit toute l'année sous les tropiques, en été et en automne dans les régions tempérées.

Les maladies transmises par les arthropodes sont évidemment les plus soumises à ce facteur saisonnier. Leur éclosion dépend avant tout du cycle de vie de l'insecte vecteur.

D'un point de vue général, en favorisant la multiplication des micro-organismes dans les milieux extérieurs à l'homme, comme l'eau, ou dans les substances alimentaires, comme le lait, le temps chaud contribue au développement des infections intestinales.

3.7.3. Infections bactériennes

3.7.3.1. Transmission par voie respiratoire : la tuberculose

Maladie mondiale, la tuberculose sévit surtout dans les grands centres surpeuplés, là où le niveau de vie est peu élevé. Elle est due essentiellement à *M. tuberculosis,* bacille tuberculeux humain, plus rarement à *M. bovis,* bacille bovin, exceptionnellement à *M. avium,* d'origine aviaire.

Bien que le bacille tuberculeux puisse se multiplier dans tous les tissus, il se fixe de préférence au niveau des poumons. C'est là qu'il détermine la primo-infection tuberculeuse qui se cicatrise naturellement dans la majorité des cas. La tuberculose pulmonaire survient soit à la suite de l'extension de cette lésion, soit à la suite d'une réinfection. Elle est caractérisée par le développement de tubercules pulmonaires, foyers infectieux entourés par un tissu de réaction de l'hôte à l'infection. Ces tubercules, en s'ouvrant, libèrent dans les bronches de grandes quantités de bacilles qui sont rejetés par les expectorations et peuvent contaminer d'autres individus.

Le mérite revient à Calmette et Guérin d'avoir ainsi préparé une souche dénuée de pouvoir pathogène. Leur vaccin, le **BCG (bacille Calmette-Guérin)**, est largement utilisé en Europe et dans de nombreux autres pays. Les enquêtes médico-sociales ont amplement démontré son efficacité et son innocuité.

Le traitement de la tuberculose pulmonaire fait appel à un nombre très limité d'agents chimiothérapeutiques : ce sont principalement la streptomycine, l'hydrazide de l'acide nicotinique (INH), la rifampicine et l'éthambutol. Étant donné le taux de mutation élevé et le risque de sélection de mutants résistants, il est indispensable d'associer au moins deux antibiotiques actifs.

De nombreuses autres infections sont transmises par voie respiratoire : la diphtérie, la méningite épidémique à méningocoque, la pneumonie, la coqueluche, les angines à streptocoque, la scarlatine.

3.7.3.2. Transmission par voie digestive : le choléra

Deux espèces de vibrions sont pathogènes pour l'homme : *V. cholerae* et *V. cholerae* El Tor. Ce sont des bacilles à Gram négatif caractérisés avant tout par leur morphologie en virgule. Le choléra avait pratiquement disparu du monde occidental. C'est une maladie essentiellement asiatique et plus spécialement localisée dans la péninsule indienne. Depuis 1961, une dizaine d'épidémies ont pourtant pris naissance à partir d'un foyer indonésien. L'épidémie du Pérou en 1990 semble marquer une recrudescence.

Le tableau clinique de la maladie est celui d'une diarrhée rebelle due à une irritation extrême de la muqueuse intestinale. Les selles « en eau de riz », les vomissements et une déshydratation intense constituent les autres signes caractéristiques. Le traitement doit donc chercher en premier lieu à rétablir l'équilibre électrolytique par perfusion intraveineuse de solutions salines. Les antibiotiques ne jouent ici qu'un rôle secondaire.

La lutte contre le choléra doit s'exercer par une information du public sur les mesures générales d'hygiène et par la vaccination imposée par le règlement sanitaire international.

Les salmonelloses, la dysenterie bacillaire, les gastro-entérites infantiles et la brucellose sont d'autres exemples d'infections digestives.

3.7.3.3. Transmission par contact : la syphilis

L'agent responsable de la syphilis est un spirochète, *Treponema pallidum.* La maladie se présente seulement dans l'espèce humaine, transmise par contact sexuel ou encore de la mère à l'enfant au cours de la grossesse par infection transplacentaire (syphilis congénitale). Elle évolue en trois étapes : la **syphilis primaire** caractérisée par le développement d'un chancre contenant habituellement des tréponèmes ; la **syphilis secondaire** au cours de laquelle apparaissent des lésions cutanées sur l'ensemble du corps ; enfin la **syphilis tertiaire** qui se signale par la gravité des lésions et une

Copyrighted material

atteinte du système nerveux central (paralysies progressives) et du muscle cardiaque.

Les antibiotiques et surtout la pénicilline, très active sur le tréponème, ont réduit considérablement la **morbidité** de cette infection dans nos pays. Une recrudescence notable a pourtant marqué la dernière décennie. Elle est due, semble-t-il, à un excès de confiance faite aux antibiotiques et corrélativement au relâchement des mesures prophylactiques.

Le cadre des **maladies sexuellement transmissibles (MST)** tend à s'élargir de nos jours. À côté de la syphilis et de la gonococcie (blennorragie), on observe de plus en plus des infections urogénitales à *Chlamydia* ou à mycoplasmes (uréoplasma).

3.7.3.4. Transmission par piqûre animale : la peste

L'agent responsable est *Y. pestis*, un petit bacille à Gram négatif. La peste est avant tout une maladie endémique de rongeurs sauvages (marmottes, gerbilles, écureuils, etc.) transmise au rat par l'intermédiaire des puces. Ces rongeurs constituent le réservoir du virus. La transmission à l'homme s'effectue à la suite des piqûres de la puce du rat. Les microbes sont transportés jusqu'aux ganglions lymphatiques proches qui augmentent de volume, s'enflamment et forment le bubon, généralement inguinal, d'où le nom de peste bubonique. À ce stade, les symptômes peuvent régresser et le malade guérir. Souvent, la barrière lymphatique est franchie et le germe passe dans la circulation sanguine (peste septicémique) ou se localise sur le poumon, déterminant une bronchopneumonie secondaire. En période d'épidémie, la contamination directe et massive d'homme à homme par voie aérienne est fréquente. C'est elle qui est cause de la peste pulmonaire, la forme la plus grave, rapidement mortelle.

Les antibiotiques (streptomycine, tétracycline) ou les sulfamides utilisés précocement au cours de la maladie sont efficaces. Le contrôle des épidémies exige cependant des mesures de prévention qui doivent s'exercer en permanence vis-à-vis du réservoir naturel du bacille pesteux (dératisation, désinsectisation).

Les infections rickettsiennes transmises par des arthropodes vecteurs tels que poux, puces et tiques sont en nette augmentation du fait des voyages (en particulier des chiens emmenés par leur maître en vacances).

3.7.4. Infections fongiques

3.7.4.1. Transmission par voie respiratoire : les aspergilloses

Les aspergilloses sont des maladies cosmopolites sévissant chez les mammifères (rarement chez l'homme), les oiseaux et les insectes. La plus fréquente et la plus grave est l'aspergillose aviaire due à *A. fumigatus*. Les spores inhalées peuvent exister à l'état saprophyte au niveau des voies respiratoires supérieures. Dans certaines circonstances favorables, elles vont proliférer et déterminer des troubles de la sphère respiratoire. Chez l'homme, l'aspergillose à *A. fumigatus* est la plus fréquente et provoque également une pathologie respiratoire.

Les aspergilloses sont souvent des maladies professionnelles : perruquiers, grainetiers, etc. La dépression immunitaire du sujet favorise la greffe et la croissance du parasite ; les anomalies anatomiques comme les cavités de tuberculose pulmonaire ulcéro-caséeuse ou les masses pseudo-tumorales pulmonaires nécrosées des mineurs de charbon sont des lieux d'élection pour le développement des tumeurs aspergillaires. Sur le plan clinique on peut distinguer :

– les **aspergillomes**, véritables tumeurs développées dans des cavités préexistantes, responsables d'hémorragies souvent graves, apparaissant en radiographie sous forme d'une image « en grelot » ;

– les **aspergilloses diffuses** broncho-pulmonaires ou pleurales, l'asthme et la bronchite aspergillaire.

Le traitement médical fait appel à des fongicides toxiques d'efficacité douteuse. L'exérèse chirurgicale représente le traitement de choix.

3.7.4.2. Transmission par contact : les dermatophytoses ou teignes

Ce sont des mycoses superficielles dues à l'action de champignons kératinophiles et kératinolytiques, les dermatophytes. D'origine tellurienne, elles sont très contagieuses. Chez les animaux, elles sont désignées sous le terme « dartres ».

L'homme y est très réceptif et certaines des dermatophytoses humaines sont d'origine animale. Elles siègent habituellement sur la tête mais peuvent aussi intéresser le revêtement cutané tout entier. Elles se manifestent par des plaques d'herpès dont on distingue habituellement trois types : les teignes sèches à inflammation discrète, épilantes ou tondantes ; les teignes suppurées à processus inflammatoire plus violent également épilantes ou tondantes ; les teignes faviques.

Le traitement est essentiellement chimique (préparations iodées, acide salicylique, sels de cuivre et de mercure, qui sont des médications locales, antibiothérapie par voie générale telle le traitement par la griséofulvine).

3.7.4.3. Mycoses à manifestation diverse : les candidoses

Ces infections peuvent aller du superficiel (peau et muqueuses) à la septicémie. On citera plus particulièrement :

– **la candidose des voies digestives supérieures ou « muguet »**, surtout fréquente chez les volailles, qui affecte aussi les mammifères, dont l'homme, chez lesquels elle se développe électivement dans la cavité buccale. Elle est alors traitée à la nystatine par voie locale ou générale selon la gravité de l'infection ;

– **la candidose des muqueuses génitales ou « muguet génital »** ; urétrite et balanite chez l'homme, vulvo-vaginite chez la femme, ces infections sont souvent d'origine vénérienne. Le traitement utilisé est également la nystatine ;

– **la candidose de la peau et des muqueuses superficielles** qui, chez l'homme, se manifeste sous forme d'eczéma des plis notamment ;

Copyrighted material

– **les candidoses profondes**, viscérales, broncho-pulmonaires, cardio-vasculaires ou céphalo-méningées, qui revêtent un aspect gravissime. Elles sont souvent d'origine autogène par suite de fautes thérapeutiques. Si le terrain est favorable, elles peuvent évoluer en forme septicémique grave.

Le principal traitement est à base d'amphotéricine B par voie intraveineuse.

3.7.5. Infections parasitaires

3.7.5.1. Transmission par voie digestive : l'amibiase

C'est une maladie extrêmement répandue dans les régions tropicales. Les mouvements de population favorisent son implantation dans les pays tempérés sous forme de petits foyers de contagion limités. L'agent responsable, *Entamoeba histolytica*, encore appelé *dysenteriae*, est un protozoaire parasite strict de l'homme qui se déplace par émission de pseudopodes. Le cycle très simple de transmission explique la diffusion massive du parasite. L'amibe, sous sa forme *histolytica*, pénètre par voie digestive jusque dans la sous-muqueuse intestinale où elle se divise par scissiparité, acquiert son caractère hématophage et provoque des ulcérations et des abcès. Elle peut aussi accéder aux vaisseaux et gagner des organes comme le foie ou le poumon où elle se multiplie. Sous la forme *minuta*, elle vit à la surface de la muqueuse et donne naissance, après plusieurs divisions, aux kystes typiques à 4 noyaux qui représentent la forme de résistance du parasite et assurent la conservation de l'espèce.

La dysenterie amibienne est l'expression clinique essentielle de l'amibiase. Elle est caractérisée par des douleurs colitiques violentes, l'émission de selles afécales muco-sanguinolentes et un état général plus ou moins altéré. Elle peut se compliquer d'abcès métastatiques, hépatiques ou pulmonaires. L'épidémiologie de la maladie est dominée par le péril fécal : la transmission des kystes est assurée par les eaux de boisson polluées, les aliments consommés crus ou souillés, les mains sales, etc.

On peut citer de nombreuses autres infections de ce type : l'oxyurose, l'ascaridiose, la tricocéphalose, le téniasis, la toxoplasmose, les échinococcoses.

3.7.5.2. Transmission par piqûre : le paludisme

C'est une maladie fébrile due à un parasite hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par un moustique vecteur, l'anophèle femelle. On estime à plus de 1 milliard, le nombre de sujets impaludés dans le monde. Quatre espèces infectent l'homme :

– ***Plasmodium vivax***, très répandu, détermine chez l'homme la fièvre tierce bénigne après une incubation de 15 jours à 9 mois ; il parasite les hématies jeunes et peut persister pendant 2 années chez l'hôte, entraînant parfois des rechutes ;

– ***Plasmodium malariae***, moins fréquent, est responsable de la fièvre quarte, après une incubation de 3 semaines environ ; il peut évoluer dans le sang durant une vingtaine d'années ;

– ***Plasmodium falciparum***, le plus répandu et le plus redoutable, se rencontre surtout sous les tropiques ; il engendre la fièvre tierce maligne dont l'incubation est de 12 jours ; les formes cliniques les plus graves sont les accès pernicieux, dominés par des troubles psychiques et neurologiques, aboutissant rapidement au coma ou à un état convulsif ; l'évolution en l'absence de traitement est constamment mortelle ;

– ***Plasmodium ovale***, beaucoup plus rare, ne joue qu'un rôle secondaire.

Le *Plasmodium* évolue selon un cycle asexué exo-érythrocytaire et un cycle endo-érythrocytaire. Le sporozoïte, forme infestante, est introduit chez l'homme par la piqûre de l'anophèle femelle. Quatre jours après, le parasite se trouve dans les hépatocytes où son noyau se divise plusieurs fois. Son développement donne naissance au schizonte qui, à maturité, éclate et libère les mérozoïtes lancés dans la circulation sanguine. Ceux-ci pénètrent dans les hématies, se nourrissent aux dépens de l'hémoglobine et se transforment en trophozoïtes puis en schizontes endo-érythrocytaires dont le développement donne une image de corps en rosace. L'éclatement des schizontes libère les mérozoïtes. Le cycle asexué peut se renouveler chez l'hôte lui-même ou évoluer en un cycle sexué. Les schizontes se transforment en gamétocytes mâles et femelles en forme de croissants *(Plasmodium falciparum)* ou de type circulaire *(Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae)*. Prélevés dans le sang par le moustique piqueur, ils subissent une série complexe de transformations et deviennent des sporozoïtes dans les glandes salivaires de l'insecte. Cette salive hautement infectante contamine le sujet sain.

La prophylaxie individuelle est assurée par la prise d'un dérivé de la quinine dès le jour du départ en zone d'endémie puis pendant toute la durée du séjour, enfin durant 2 mois après le retour. La prophylaxie générale a été conduite par des campagnes de désinsectisation et d'assainissement des terres en même temps que par la chimioprophylaxie collective.

Les médicaments antipaludiques comprennent la quinine et les produits de synthèse schizonticides ou gaméticides appartenant à différentes séries chimiques.

Les filarioses, les trypanosomoses (maladie du sommeil) et les leishmanioses ont un mode de transmission semblable.

3.7.5.3. Transmission par contact : les bilharzioses

Les bilharzioses sont transmises par des trématodes du genre *Schistosoma* dont le cycle évolutif nécessite un hôte intermédiaire, un mollusque vivant dans les eaux douces tropicales. Les œufs, pondus par les femelles localisées dans les ramifications veineuses de l'intestin ou de la vessie, sont éliminés avec les selles. Au contact de l'eau nécessaire à leur évolution, ils éclosent et libèrent un *miracidium* qui pénètre dans le mollusque hôte et subit des transformations, dont les formes ultimes sont les cercaires à queue bifide ou furcocer-

Copyrighted material

caires. Ces larves circulent dans l'eau, prêtes à pénétrer par effraction en quelques minutes à travers la peau humaine. Elles gagnent alors le foie par voie sanguine et deviennent adultes ; les femelles fécondées migrent dans leur territoire d'élection pour y pondre leurs œufs.

On distingue trois formes cliniques essentielles :

– la **bilharziose urinaire** due à *Schistosoma haematobium* est très répandue en Afrique, au Proche-Orient et au Moyen-Orient. L'hôte intermédiaire est un bullidé. La maladie contractée au cours des bains en rivières se manifeste par des hématuries accompagnées de troubles fonctionnels (pollakiurie) et de sensations de brûlure au niveau du col vésical et de l'urètre : elle peut évoluer en complications urogénitales ; le passage à la chronicité traduit un certain équilibre hôte-parasite ;

– la **bilharziose intestinale**, tout aussi fréquente, due à *Schistosoma mansoni*, sévit surtout en Amérique du Sud et en Afrique. L'hôte intermédiaire est une planorbe. La symptomatologie peut être localisée à la sphère intestinale : elle peut se compliquer et évoluer en formes hépato-spléniques fibreuses de sombre pronostic ;

– la **bilharziose artério-veineuse** *(Schistosoma japonicum)* est une forme plus rare qui sévit essentiellement en Extrême-Orient et provoque des troubles hépato-spléniques.

Quelle que soit la forme clinique de la maladie, la prophylaxie fait appel aux mêmes impératifs. Elle est conditionnée avant tout par l'élévation du niveau de vie. La lutte est actuellement orientée contre les réservoirs du virus par la destruction des mollusques, hôtes intermédiaires.

L'anguillulose, la trichomonase et les ankylostomoses relèvent du même mécanisme de transmission.

3.7.6. Infections dites émergentes

À côté des infections parfaitement connues et décrites, il en est d'autres dont l'apparition semble être la rançon de l'évolution de nos sociétés, de notre mode de vie. La légionellose ou maladie des légionnaires en est l'exemple type. Elle s'est manifestée de façon impressionnante pour la première fois en 1976, à l'occasion de la convention de l'American Legion à Philadelphie, sous forme de pneumonie foudroyante, atteignant 182 personnes sur 4 400 avec 16 % de mortalité. C'est une pneumopathie aiguë qui se déclare essentiellement chez l'homme adulte (de plus de 40 ans) par l'intermédiaire d'aérosols contaminants. L'agent infectieux, *Legionella pneumophila,* est une bactérie commune des milieux aquatiques dont la multiplication est favorisée par un environnement chaud et humide, tel que celui qui est produit par l'air conditionné ou dans les tours de refroidissement des climatiseurs ou encore au niveau des condensateurs de centrales thermiques, ou même dans les eaux chaudes sanitaires, etc. On peut dire qu'il s'agit d'une maladie de la civilisation.

Les infections dites émergentes regroupent les maladies dues à des agents pathogènes découverts récemment aussi bien que celles dues à de nouvelles souches d'agents infectieux connus. La plupart d'entre elles produisent les symptômes typiques d'une infection aiguë : fièvre, céphalées, douleurs musculaires, vomissements et diarrhée. Certaines ne cèdent à aucun traitement. Quelques exemples de ces infections les plus connues au potentiel épidémiologique inconnu figurent dans le *tableau VII.12*.

3.7.7. Infections nosocomiales

On appelle infections nosocomiales (du grec *nosos,* maladie, et *komein,* soigner, et, par extension, du latin *nosocomium,* hôpital) les maladies infectieuses contractées pendant une hospitalisation. Elles sont inévitables dans bien des cas et relativement fréquentes (de l'ordre de 5 à 7 % des patients hospitalisés). On peut étendre cette définition à toute infection touchant un membre du personnel soignant au cours de son activité de soins. Ces infections présentent divers degrés de gravité et constituent un important enjeu de santé publique, qui concerne aussi bien les patients et leur entourage que l'ensemble des professionnels de la santé.

3.7.7.1. Causes d'une infection nosocomiale

Pour qu'une infection se développe chez un malade à l'hôpital, il faut *a priori* trois éléments :

– une source d'infection, c'est-à-dire un milieu contaminé par des germes, le plus souvent des bactéries ;

– un vecteur capable de transporter les germes de la source vers le patient ;

– un malade qui présente une réceptivité particulière à l'infection du fait des traitements ou des soins qu'il reçoit (par exemple, baisse des défenses immunitaires favorisée par un traitement contre le cancer). Cette réceptivité, qui favorise la multiplication des germes, varie grandement d'un malade à un autre en fonction de la maladie sous-jacente et du type de traitement administré.

Copyrighted mater

Tableau VII.12 – Infections émergentes.

Agent	Cause de leur disparition	Mode de transmission	Symptômes	Traitement
Filovirus (Ebola, Marburg)	Hôte naturel encore non identifié ; études en cours dans les forêts de la Côte d'Ivoire afin d'identifier le réservoir hébergeant le virus Ebola.	Contact direct avec du sang, des organes, des sécrétions ou du sperme contaminés.	Brusque poussée de fièvre, diarrhée, vomissements, syndrome hémorragique.	Pas de thérapie spécifique, mal incurable.
Hépatite C	Mauvaises pratiques suivies en matière de transfusion sanguine après la Deuxième Guerre mondiale.	Contact avec du sang ou du plasma contaminés ; transmission sexuelle.	Nausées, vomissements, jaunisse ; l'infection chronique est favorable au carcinome et à la cirrhose.	L'interféron α-2b pour l'hépatite C chronique Seuls de 10 à 15 % des malades ont une rémission à long terme.
Virus de l'immunodéficience humaine (sida)	Accroissement des déplacements, migration vers les villes, multiplication des relations sexuelles, toxicomanie, transfusions sanguines.	Contact, notamment sexuel, avec du sang ou des tissus cellulaires d'une personne infectée.	Grave perturbation du système immunitaire, infections opportunistes.	Des antiviraux peuvent ralentir l'évolution, traitement des infections opportunistes dues à l'immunosuppression.
Escherichia coli 01577	Contamination de la viande pendant l'abattage ou la manutention, cuisson insuffisante de la viande.	Ingestion d'aliments contaminés : bœuf mal cuit ou lait cru.	Syndrome urémique hémolytique, colite hémorragique.	Réhydratation par voie orale ou intraveineuse.
Choléra	Multiplication des déplacements (la récente épidémie en Amérique du Sud avait débuté en Asie) ; chloration insuffisante de l'eau ; mauvaises conditions sanitaires.	Ingestion d'eau ou d'aliments ayant été contaminée par les matières fécales de personnes infectées.	Diarrhée grave, déshydratation rapide.	Les souches récentes résistent à plusieurs antibiotiques.
Paludisme	Déplacements dans les régions infectées par les moustiques, urbanisation, modification biologique du parasite, changements environnementaux, résistance aux antibiotiques.	Piqûre d'un moustique (anophèle) infecté.	Fièvre, céphalées, accompagnées souvent d'insuffisance respiratoire ou rénale.	Chloroquine, mais le paludisme est parfois résistant à la plupart des médicaments.

Copyrighted material

• **Les xéno-infections.** Elles ont lieu à l'entrée dans la communauté hospitalière de nouveaux malades ou lors du transfert des patients d'une structure hospitalière à une autre, elles sont plus rarement le fait du personnel ou de visiteurs porteurs d'une maladie infectieuse susceptible d'augmenter les épidémies nosocomiales.

• **Les exo-infections.** Des erreurs ou des insuffisances techniques amènent au contact des malades des micro-organismes pathogènes alors même que toutes les précautions étaient censées être prises pour les en protéger : stérilisation inefficace, ventilation non stérile.

3.7.7.3. *Quelques exemples d'actualité*

3.7.7.3.1. *Problèmes des* Klebsiella *et staphylocoques multirésistants*

La France est pratiquement la « championne toutes catégories », parmi les pays développés, pour ce qui concerne la résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières. Ainsi, la proportion d'isolats multirésistants, tels que les *St. aureus* résistants à la méthicilline (SARM), sont parmi les plus élevés d'Europe. De même, la France a été le premier pays à connaître la diffusion épidémique des souches de *Klebsiella* productrices de nouvelles enzymes plasmidiques conférant une résistance aux β-lactamines à large spectre.

Les objectifs de la prévention de la diffusion des SARM et *Klebsiella* β-SE sont de détecter précocement les malades porteurs, infectés ou colonisés, et de s'opposer à la transmission de ces souches dans l'hôpital, essentiellement par l'intermédiaire du manuportage. Le lavage des mains, l'approvisionnement suffisant en matériel à usage unique (gants non stériles, tabliers de protection, masques…), l'isolement des malades infectés, le traitement de certains sites infectieux à haut risque de dissémination même en l'absence de signes cliniques (urines infectées essentiellement) et, enfin, le dépistage systématique des malades colonisés sont les principales mesures à mettre en œuvre.

3.7.7.3.2. *Problèmes actuels liés à l'utilisation de l'eau en milieu hospitalier*

La consommation d'eau en milieu hospitalier est très importante. Sur le plan microbiologique, le risque est lié à des micro-organismes présentant un risque spécifique dans ce milieu : ce sont avant tout des bacilles à Gram négatif pour lesquels le milieu hydrique est un réservoir de choix (par exemple, *Pseudomonas, Acinetobacter, Xanthomonas*, etc.). La voie cutanéo-muqueuse par contact est la plus classique pour la contamination, mais la voie respiratoire après aérolisation (*Legionella*), voire la voie digestive (*Yersinia, Listeria*) sont de plus en plus souvent retrouvées. Les mycobactéries atypiques et les virus ont une importance plus limitée mais peuvent être à l'origine de petites épidémies tout à fait caractéristiques.

Ce type de flore, dite opportuniste, peut être responsable d'infections nosocomiales dont l'incidence n'est notable que lorsque le niveau de prévention des infections d'autre origine est élevé et que les patients présentent un terrain réceptif.

3.7.7.3.3. *Exemple de* Legionella

L'eau froide (< 25 °C dans la réglementation française) ne contient qu'éventuellement une faible concentration de *Legionella* ($< 10\ L^{-1}$), incapables de provoquer une infection même sous forme d'aérosol. En revanche, issues de ballons de stockage, les eaux chaudes sont toujours très contaminées par les Legionella si leur température n'atteint pas 55 à 60 °C. En effet, *Legionella pneumophila* est une bactérie thermophile, proliférant très bien à 44-45 °C, température souvent retrouvée, ainsi que toutes les matières nutritives nécessaires à la croissance, dont le fer, dans le fond des ballons avec des débris organiques et minéraux. Chaque douche sera alors une excellente occasion d'inhaler des *Legionella*. Il en est de même avec certains systèmes de climatisation de l'air.

La prévention consiste à régler les cumulus ou autres installations à 60 °C au moins, en se rappelant qu'une réglementation interdit en France la distribution d'eau chaude collective à une température supérieure à 60 °C (risque de brûlure des usagers).

3.7.7.4. *Lutte contre les infections nosocomiales*

Dans une perspective de santé publique, la lutte contre les infections nosocomiales passe par le contrôle des trois éléments de la chaîne, à savoir l'environnement hospitalier qui représente les sources d'infection, les modes de transmission de l'infection et, enfin, les facteurs de réceptivité liés au malade ou à sa maladie, dont le contrôle est souvent le plus difficile à réaliser.

4. Vaccination, sérothérapie

Largement à l'origine de la baisse de la morbidité et de la mortalité infectieuse, la **vaccination** et la **sérothérapie** présentent un intérêt médical considérable. Systématiquement utilisées, surtout dans les pays occidentaux, elles ont permis de contrôler la plupart des maladies infantiles et des épidémies graves, telle l'éradication complète de la variole ou de la diphtérie au début des années 1980 (*fig. VII.16*).

Vaccination et sérothérapie représentent deux approches différentes de la lutte contre les infections. La vaccination est une approche **préventive**

Copyrighted material

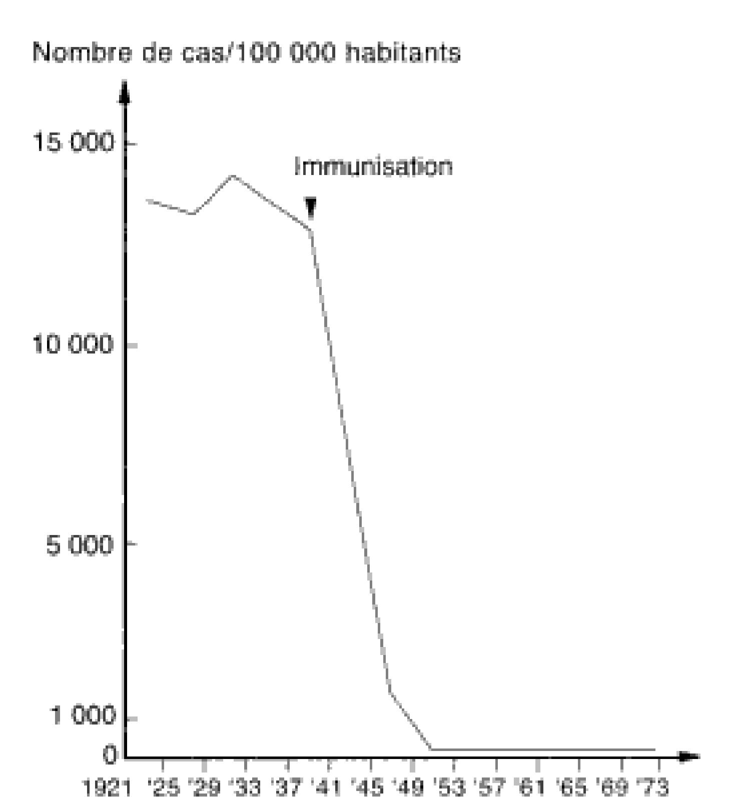


Figure VII.16 – **Évolution des cas déclarés de diphtérie en Angleterre et au Pays de Galles depuis les années 20 (cas pour 100 000 habitants) et influence de l'apparition de la vaccination.**

fondée sur la faculté de faire acquérir à l'organisme ses moyens de défense immunitaire spécifiques afin d'éviter la maladie ; c'est une **immunité active** qui est installée et pour une durée importante. La sérothérapie, au contraire, constitue une **approche curative** lors de laquelle on fournit à l'organisme les moyens immunitaires de se défendre alors que l'infection est déjà déclarée. C'est là une **immunité** acquise de façon **passive** et, de plus, qui est très limitée dans le temps.

4.1. Immunité active : la vaccination

4.1.1. Principe et généralités

Déjà dès le XI[e] siècle, les Chinois, constatant que la **variole** ne récidivait pas, pratiquèrent ce que l'on a appelé la **variolisation**. Cette opération consiste à appliquer le suc d'une pustule d'un individu atteint de variole bénigne sur une scarification réalisée sur la peau d'un sujet sain ; la variole bénigne ainsi provoquée protège ce sujet contre les futures épidémies. Beaucoup plus tard, le médecin anglais Jenner inocula la **vaccine** (maladie des vaches ou *cow-pox*) à des jeunes gens et les protégea ainsi contre la variole ; il procéda de la même manière que les Chinois en utilisant le suc des pustules des vaches malades. Pasteur, lors de ses travaux sur le **choléra des poules**, montra au XIX[e] siècle qu'une immunisation était possible en utilisant le microbe vivant mais atténué. C'est enfin la date symbolique de juillet 1885, où Pasteur réalisa la vaccination du petit Joseph Meister contre la **rage**.

La vaccination a donc pour but d'établir chez un sujet non immunisé un état de protection comparable à celui que procure la maladie naturelle apparente ou inapparente. Elle oblige l'organisme à réagir et à mettre en œuvre les mécanismes complexes de la réponse immunitaire. Elle invoque la participation de facteurs humoraux et cellulaires souvent étroitement imbriqués les uns aux autres.

L'immunité acquise par la vaccination n'est conférée qu'après un certain délai, celui nécessaire au développement de la réponse immunitaire et, en particulier, de la production d'anticorps. Cette réponse dépend, nous l'avons vu, d'un grand nombre de conditions (voir § 3.5.2.). Elle est amplifiée par des injections répétées (3 injections à 3 semaines d'intervalle par exemple), par des adjuvants artificiels (sels d'alumine), par des systèmes d'associations (vaccination associée antidiphtérique, antitétanique, antityphoïdique, dite DT-TAB). Elle est aussi fonction du type de vaccin, de son mode d'administration et du sujet vacciné, c'est-à-dire du terrain. Dans tous les cas, elle cherche à assurer une protection de longue durée.

4.1.2. Différents types de vaccins

Les vaccins peuvent être schématiquement classés en deux grandes catégories : les vaccins dits **classiques**, dont la mise au point reprend les connaissances acquises depuis le XVIII[e] siècle et qui sont préparés à partir du microbe lui-même, et ceux dits **modernes**, dont la préparation fait appel aux progrès de la biologie moléculaire.

Copyrighted mater

4.1.2.1. Vaccins « classiques »

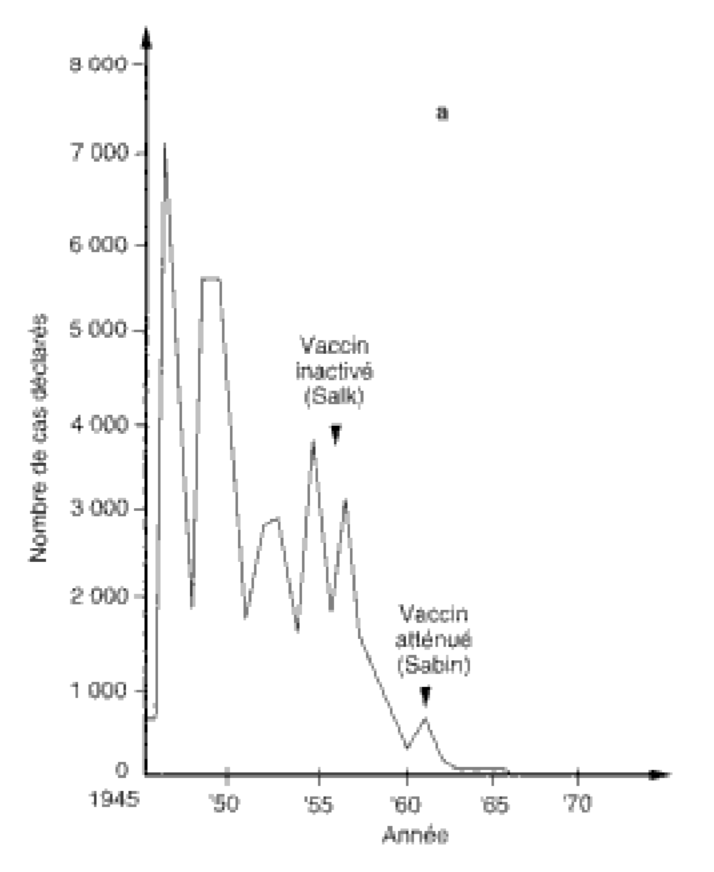
Mis au point depuis les débuts de la vaccination à l'instar de Pasteur en 1885, ils peuvent être répertoriés en trois groupes.

• **Vaccins « tués »** ou « inactivés », c'est-à-dire mis au point à partir de microbes tués (inactivés). Ce principe a été établi par le bactériologiste Wrigth après les découvertes de Pasteur. C'est par exemple le vaccin dit TAB (antityphoïdique et antiparatyphoïdique A et B), dans lequel les bacilles typhiques sont préalablement tués par la chaleur ou l'éther, de même que les vaccins antipoliomyélitiques de Salk (abandonné depuis), antigrippaux, antirabiques, anticholérique, anticoquelucheux… Cependant, ces vaccins sont peu à peu abandonnés au vu de leur efficacité d'immunisation limitée *(fig. VII.17)*.

• **Vaccins « vivants »** ou « atténués », c'est-à-dire préparés à partir de micro-organismes vivants inoffensifs pour l'homme ou à partir de **micro-organismes atténués**. C'est l'application du principe utilisé par Pasteur lors de ses travaux sur le choléra des poules. Le vaccin antipoliomyélitique de Sabin est ainsi constitué de poliovirus ayant perdu leur pouvoir neurotoxique à la suite de repiquages successifs sur cultures de cellules. Le vaccin antituberculeux, bien connu sous le nom de BCG, est obtenu à partir de bacilles tuberculeux d'origine bovine atténués par repiquages successifs sur milieu bilié. Le but de ces méthodes est d'obtenir des micro-organismes identiques au germe virulent mais ayant perdu leur activité pathogène. De cette manière, on augmente la durée et l'intensité d'immunisation.

Cela dit, les vaccins vivants présentent des inconvénients non négligeables : difficulté d'entretenir les souches, possibilité de réapparition d'une souche virulente, rares vaccins polyvalents, possibilité de contamination accidentelle.

• **Vaccins « antitoxiques »**. Ils ne concernent que la lutte contre les infections toxigènes. Ils consistent à rendre les toxines inoffensives tout en conservant leur immunogénicité, c'est-à-dire à obtenir des **anatoxines**. Ce principe a été mis au



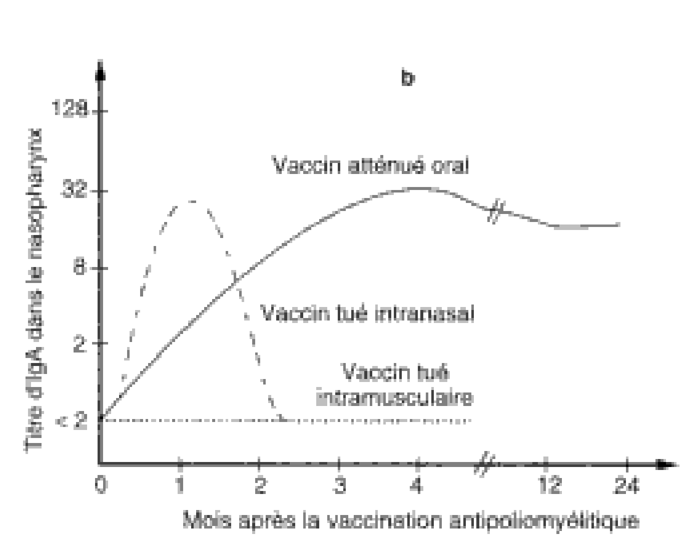


Figure VII.17 – **Efficacités comparées des différents types de vaccins.**

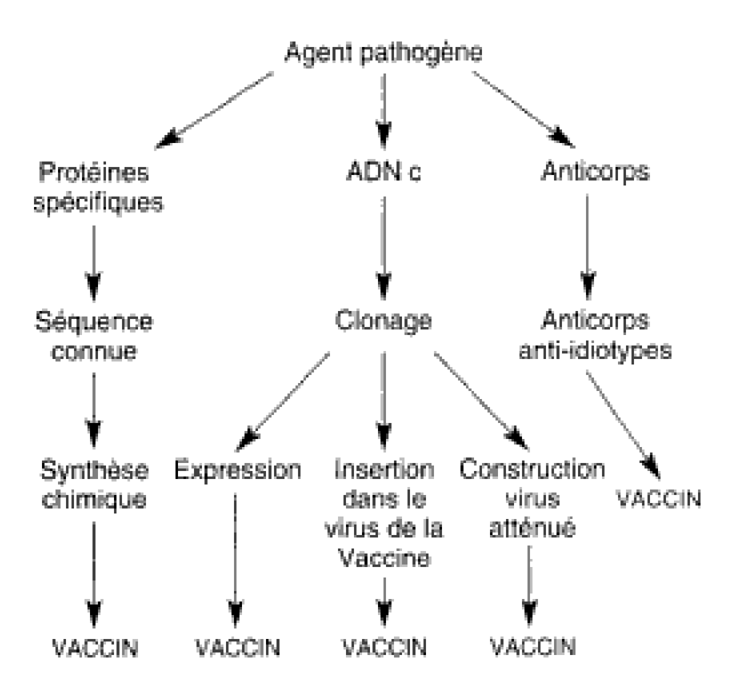
a : effets comparés des vaccins tués et atténués antipoliomyélitiques en Angleterre et au Pays de Galles entre les années 1945 et 1970 (exprimé en nombre de cas déclarés pour 100 000 habitants) ;

b : étude de la réponse immunitaire locale obtenue (IgA) selon le type de vaccin utilisé et son mode d'administration.

Copyrighted material

Hidden page

Tableau VII.16 – Différentes méthodes de préparation des vaccins « modernes ».



teuse. De nombreuses recherches sont en cours : vaccin contre la rage, contre le paludisme.

• **Les vaccins « recombinants vivants »**, dans lesquels l'ADNc est inséré dans un virus atténué (virus de la vaccine le plus souvent). Préparé selon ce principe, le vaccin contre la rage est un succès récent et a permis de traiter les renards à grande échelle en le dissimulant dans des appâts largués par hélicoptère. Ce même principe fait l'objet de recherche dans la course contre la montre destinée à la mise au point d'un vaccin contre le sida.

• **Les vaccins « de synthèse »**, obtenus chimiquement à partir des connaissances sur la séquence de peptides à activité immunogène. Souvent de petite taille, ils doivent être associés à des adjuvants. Ainsi, en 1982, a été mis au point un vaccin entièrement synthétique protégeant les souris contre la diphtérie. Des recherches sont en cours sur la fièvre aphteuse, la poliomyélite, la grippe, la rage…

• **Les vaccins « anti-idiotypes »**. Ce sont des anticorps anti-idiotypes, c'est-à-dire dirigés contre le site le plus spécifique de l'anticorps. Ils constituent donc de véritables « négatifs » de ce site et, par là, des « copies conformes » du site antigénique considéré. Théoriquement séduisant, ce principe reste difficile à mettre en application. Actuellement, on en est toujours au stade des recherches : vaccin contre l'hépatite B, contre la rage, contre la trypanosomiase africaine.

4.1.3. Modalités des vaccinations

Comme nous l'avons vu au § 3.5.2, l'apparition et la durée de vie des anticorps sont précises et limitées. Cela implique donc que la vaccination soit d'une utilisation précise permettant de conférer sans danger l'immunité la plus rapide et la plus durable possible. Il faudra donc envisager le mode d'administration, les doses administrées, les rappels et leur fréquence, l'âge du sujet.

• **Indications des vaccins**. On distingue les vaccinations « obligatoires » correspondant à la législation en vigueur. Ces immunisations constituent une obligation légale stricte, seul le choix du vaccin est laissé à l'appréciation du médecin. Viennent ensuite les vaccinations « internationales » exigées pour un voyage à l'étranger. Enfin, les vaccinations « médicales » obéissent uniquement à une opportunité thérapeutique (rappel en dehors des exigences légales ; vaccinations facultatives chez des sujets fragiles telles celles contre la grippe, la rubéole, la rougeole, la coqueluche ; vaccination thérapeutique telle la vaccination antirabique après une morsure suspecte). En outre, il existe des contre-indications dont il faudra tenir compte : sujets atteints de déficit immunitaire, traités aux corticoïdes, aux irradiations, femmes enceintes (vaccins antirougeoleux et antirubéoleux), problèmes d'hypersensibilité immédiate ou retardée…

• **Calendrier des vaccinations**. Sous ce terme générique, on entend plusieurs critères qui vont conditionner l'efficacité de la vaccination : l'âge, les doses, l'ordre, le rythme, les rappels et les associations possibles.

Comme nous l'avons vu au § 3.5.2, l'immunisation exige du temps (apparition des anticorps et des lymphocytes spécifiques) et ne confère pas une protection infinie (notion de réponse primaire, secondaire), d'où l'intérêt des rappels. Tout ceci conduit à l'établissement d'un calendrier précis comme celui des vaccinations infantiles.

L'association de vaccins présente l'avantage de diminuer le nombre des injections. Cependant, elle doit répondre à des règles strictes : indifférence ou mieux synergie, non-intensification des réactions vaccinales locales ou générales propres au vaccin ou non-apparition de nouvelles réactions. Deux

Copyrighted material

types d'associations peuvent être envisagés : vaccinations « combinées » où les vaccins sont mélangés dans la même seringue soit lors de la préparation commerciale (vaccin DTCoq) ou au moment de l'injection (vaccin TétraCoq) ; vaccinations « simultanées » où les vaccins sont administrés en des points différents (par exemple DTCoq en sous-cutané + polio *per os*).

• **Modes d'injection**. L'injection par voie sous-cutanée est utilisée pour les anatoxines et les vaccins inactivés, la voie orale *(per os)* de même que la technique par bague pour les vaccins atténués.

Récemment, on s'est intéressé à des techniques utilisant les liposomes comme vecteurs du vaccin. Ces vésicules artificielles à membrane lipidique pourraient véhiculer la molécule vaccinale, tout en la protégeant, jusqu'aux cellules du système immunitaire.

4.2. Immunité passive : la sérothérapie

4.2.1. Principe

Après la célèbre découverte de la sérothérapie antitétanique au XIXe siècle, Roux et Martin, chercheurs français, démontrèrent, vers 1894, le pouvoir curatif d'un sérum antidiphtérique. Par la suite seront mis au point des sérums antivenimeux, antibotuliniques…

Cette technique consiste à injecter chez un sujet des anticorps protecteurs en grande quantité, sous forme d'immunsérums purifiés provenant d'un animal hyperimmunisé. La protection est dans ce cas immédiate, mais l'organisme receveur n'élabore lui-même aucun système de défense ; c'est une immunité passive. De plus, la protection est limitée dans le temps (quelques semaines). Cependant, elle permet de juguler efficacement une infection contre laquelle le sujet n'aurait pas été préalablement vacciné.

4.2.2. Différents types de sérums

Historiquement, ce sont les sérums d'origine animale qui ont été les premiers utilisés (sérum de cheval). Ils apportent des anticorps **hétérologues**, qui sont donc des protéines « étrangères » pour le receveur. De ce fait, l'organisme peut réagir contre eux et cela va conduire à des **maladies sériques** (œdème du visage, atteintes rénales) ou à des **chocs anaphylactiques**, mortels en quelques minutes (collapsus cardio-vasculaire, convulsions). Cependant, ces risques peuvent être évités par des injections fractionnées (méthode de Besredka : 1/10 de la dose nécessaire, attente de 15 minutes puis, si tout va bien, injection du 1/4 de la dose et attendre encore 15 minutes avant d'injecter le reste). Pendant longtemps, ces sérums ont été injectés dans les cas de risque tétanique ou diphtérique.

Maintenant, on cherche à utiliser des préparations d'anticorps **homologues**, par exemple des immunoglobulines sériques humaines (ISG) composées essentiellement d'IgG. Cependant, elles ne doivent pas être injectées par voie intraveineuse, les risques de choc anaphylactique étant trop importants. Il en va de même des immunoglobulines spécifiques préparées à partir de sérums de malades ou de sujets vaccinés répertoriés (**plasmaphérèse**).

4.2.3. Modalités de la sérothérapie

La sérothérapie doit être réalisée précocement et massivement : on injecte jusqu'à 100 000 unités d'immunsérum par voie intramusculaire. En cas de diphtérie ou de tétanos cliniquement déclaré, c'est le seul traitement auquel on peut avoir recours, les agents antibactériens comme les antibiotiques pouvant s'opposer à la multiplication des micro-organismes mais en aucun cas aux toxines déjà produites. Le sérum et l'anatoxine peuvent être associés avec profit, la protection immédiate du sérum étant consolidée secondairement par l'anatoxine.

La sérothérapie trouve donc contre les germes toxigènes son application principale. De toutes les façons, elle ne doit être employée qu'avec d'infinies précautions et en dernier recours.

Dans le même ordre d'idée, on tente à l'heure actuelle de mettre au point des transferts de cellules immunocompétentes dans le cas d'infections déclarées où les anticorps sont inefficaces. C'est le cas des infections à mycobactéries ou des infections virales faisant intervenir une réponse à médiation cellulaire. On peut injecter le « facteur de transfert », nucléopeptide extrait des leucocytes et stimulant la transformation des lymphocytes. On peut aussi injecter des lymphocytes entiers afin de rétablir une immunité déficiente.

Copyrighted material

ration……………… à une infection, dans le second c'est une opération………………

10. En………………, il est important de travailler avec des sérums……………… (provenant d'organismes………………), et non……………… (provenant d'organismes………………), pour éviter tout phénomène d'allergie ou de………………

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. Les termes parasitisme et symbiose sous-entendent un type de relation obligatoire pour au moins un des deux partenaires.

2. La dose létale 50 % (DL 50) est la dose de toxines égale à la moitié de la dose minimale mortelle (DMM).

3. Une toxine protéique est sécrétée systématiquement par la cellule bactérienne lors de sa croissance.

4. Une endotoxine est caractérisée par le fait qu'étant liée au corps bactérien, elle ne sera jamais sécrétée par la cellule.

5. Une toxi-infection est définie comme une infection où seule l'action d'une toxine engendre des désordres physiologiques.

6. Toxi-infection et intoxination sont des termes équivalents.

7. Une infection mixte est une infection résultant du développement de deux agents infectieux.

8. Les vaccins « antitoxiques » sont constitués par des antitoxines préparées à partir d'animaux immunisés par des toxines bactériennes.

9. Le principe des rappels de vaccination est fondé sur le fait que les anticorps et les cellules (lymphocytes) mémoires ont une durée de vie limitée et que l'organisme répond avec plus d'intensité à des injections répétées.

10. En sérothérapie, le fait que le sérum utilisé soit homologue ou non a peu d'importance pourvu qu'il ait été extrêmement purifié.

3. Pouvoir pathogène du bacille botulinique

Le bacille botulinique est une bactérie saprophyte très répandue dont la présence dans une conserve alimentaire est à redouter.

1. Qu'est-ce que le saprophytisme ? Quels sont les différents modes de relation hôte-bactérie possibles ? Les définir et donner un exemple typique dans chaque cas.

2. À quelle flore appartient le bacille botulinique ? Quelles sont les caractéristiques de cette flore expliquant que cette bactérie soit particulièrement à craindre dans les conserves familiales ?

3. Quelles sont les méthodes permettant d'isoler au laboratoire les bactéries qui appartiennent à cette flore ? Décrire les techniques, préciser les milieux de culture utilisés.

4. L'inoculation sous-cutanée d'une culture de bacille botulinique ou de son filtrat entraîne chez la souris des paralysies puis la mort. Que peut-on en déduire quant au pouvoir pathogène de cette bactérie ? Quels sont le ou les produits sécrétés qui lui confèrent ce pouvoir pathogène ? Quelles en sont la nature et les propriétés ?

5. La vaccination antibotulinique, bien que non pratiquée chez l'homme, est possible. La sérothérapie est pratiquée lors du botulisme. Définir vaccination et sérothérapie en précisant quelles sont les substances utilisées dans chacun des cas et quel est leur intérêt.

4. Étude de la production de toxines

On se propose de suivre en parallèle, l'évolution de la croissance d'une souche bactérienne toxigène et la production de toxines. Pour cela, on dispose d'une série de fioles contenant chacune 20 mL de milieu et ensemencées de la même façon avec un *inoculum* identique. À chaque temps, on sort une fiole de l'étuve et on réalise une numération bactérienne par turbidimétrie puis, après avoir filtré, on dose la toxine sur un aliquot du filtrat obtenu. La numération est exprimée en LnN (N : nombre de bactéries par millilitre). La quantité de toxines produite est exprimée en nombre de DMM (dose minimale mortelle) par millilitre de filtrat. On obtient les résultats suivants :

t (minutes)	LnN	Nombre DMM/min
0	16,10	0
20	16,10	0
40	16,25	0
60	16,55	0
80	17,50	0
100	18,85	300
120	20,25	600
140	21,65	900
160	23,00	1 200
180	23,85	1 315
200	24,15	1 440
220	24,20	1 450
240	24,20	1 450

1. Définir la DMM.

2. Comment détermine-t-on en pratique cette DMM.

3. Tracer sur le même graphe les courbes LnN = $f(t)$ et Nb DMM = $f(t)$. Les analyser. Que peut-on en déduire sur la nature de la toxine produite ?

5. Étude du pouvoir pathogène de *St. aureus*

St. aureus est responsable de septicémies au pronostic grave chez des sujets hospitalisés et affaiblis. La porte d'entrée des septicémies thromboemboliques est souvent une plaie surinfectée et le pouvoir pathogène repose surtout sur les capacités de multiplication et d'invasion du germe.

1. Donner la définition d'une septicémie.

2. Expliquer le mécanisme d'apparition d'une septicémie d'origine thromboembolique (on pourra illustrer par des schémas).

3. Citer deux facteurs sécrétés par *St. aureus* et qui contribuent au pouvoir pathogène lors d'une septicémie et justifier leur rôle.

4. Pour l'un des facteurs dont la recherche est effectuée au laboratoire, expliquer sommairement le principe des tests réalisés et la signification des résultats obtenus.

6. Étude du pouvoir pathogène de *S. typhi*

On prélève aux temps t_1 = phase exponentielle, t_2 = fin de phase exponentielle, t_3 = phase stationnaire et t_4 = phase de déclin d'une culture de *S. typhi* 1 mL de milieu. Chaque prélèvement est injecté à un cobaye. Les animaux ainsi inoculés présentent tous les mêmes troubles : état de choc avec fièvre élevée, diarrhée, prostration ; ils meurent en moins de 24 heures.

On constate d'autre part, chez les animaux inoculés, que les troubles apparaissent beaucoup plus rapidement pour les prélèvements effectués aux temps t_3 et t_4 que pour ceux effectués aux temps t_1 et t_2.

Si les bactéries prélevées aux temps t_1 et t_2 sont, préalablement à leur inoculation aux cobayes, lysées par les ultrasons, les troubles apparaissent alors encore plus rapidement que pour les prélèvements effectués aux temps t_1 et t_2 et correspondant à des bactéries non soumises à l'action des ultrasons.

1.1. Justifier l'apparition plus rapide des troubles d'une part pour les cultures prélevées à t_3 et t_4 par rapport aux cultures prélevées à t_1 et t_2 (ces dernières n'ayant pas été traitées par les ultrasons).

1.2. La justifier d'autre part pour les cultures prélevées à t_1 et t_2 et ayant été traitées par les ultrasons par rapport aux cultures prélevées aux mêmes temps mais n'ayant pas subi l'action des ultrasons.

2. Quel effet produirait chez le cobaye l'injection de 1 mL d'un filtrat de la culture de *S. typhi* prélevée au temps t_2 ?

3. Quelle conclusion peut-on tirer de l'ensemble de ces expériences quant à la localisation de la substance responsable des troubles observés ?

4. En déduire la nature chimique de cette substance chez la bactérie étudiée.

5. Rappeler les principales propriétés biologiques de ce groupe de substances rencontrées chez les *Salmonella* ainsi que chez de nombreux autres bacilles à Gram négatif.

Citer une bactérie d'un genre autre que *Salmonella* et dont le pouvoir pathogène repose en grande partie sur la présence d'une substance analogue.

6. Comment mesure-t-on, au laboratoire, les effets toxiques de ces substances ? Quels paramètres détermine-t-on ? Donner leurs définitions.

Les valeurs respectives de ces paramètres sont-elles supérieures ou inférieures à celles que l'on obtiendrait, au cours d'une étude expérimentale similaire, à partir de la substance responsable des troubles observés chez un malade atteint du tétanos ? Justifier la réponse.

7. Étude du pouvoir pathogène de *Str. pneumoniae*

1. On réalise l'expérience suivante à partir de deux souches, A et B, de *Str. pneumoniae* :

– chaque souche est injectée, à raison de 0,5 mL de suspension, par voie intrapéritonéale à une souris ;

– la souris qui a reçu l'injection de la souche A meurt au bout de 24 heures, l'autopsie montre une tuméfaction de tous les organes ;

– la souris ayant reçu l'injection de la souche B ne présente aucun trouble même au bout de plusieurs jours.

1.1. Donner la définition du pouvoir pathogène.

1.2. Dans l'expérience décrite ci-dessus, les recherches de toxines effectuées chez les souches A et B s'avèrent toutes négatives. Quel est alors le facteur qui a joué un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène de la souche A ? Justifier la réponse. Comment intervient ce facteur dans l'organisme ?

1.3. On effectue deux colorations de Gram, l'une sur un calque d'organe de la souris A, l'autre sur la suspension injectée à la souris B. Schématiser les observations faites et les légender.

1.4. Citer une autre espèce bactérienne chez qui ce même facteur explique, au moins en partie, le pouvoir pathogène.

1.5. D'autres facteurs peuvent être sécrétés par les bactéries et leur conférer un pouvoir pathogène tout en ne correspondant pas à des toxines. Donner deux exemples en précisant chaque fois le nom de la bactérie concernée et en expliquant comment agissent ces facteurs.

2. *Str. pneumoniae* fait partie de la flore commensale. Il peut être responsable d'infections primaires plus ou moins graves et se manifeste également comme agent de surinfection. Ces maladies infectieuses se rencontrent avec une fréquence élevée chez les vieillards, les très jeunes enfants, les diabétiques, les éthyliques et les convalescents. Ces sujets constituent un « terrain » favorable au germe.

2.1. Définir les termes flore commensale, infection primaire et terrain. Quelle particularité commune présentent les sujets qui constituent le « terrain » de *Str. pneumoniae ?*

2.2. Comment appelle-t-on les bactéries dont le pouvoir pathogène ne s'exerce que dans des conditions particulières de « terrain », comme c'est le cas pour *Str. pneumoniae ?*

3. Pour d'autres bactéries telles que *S. typhi*, le pouvoir pathogène se manifeste de manière pratiquement systématique lorsque le germe est présent dans l'organisme.

À quelle catégorie appartiennent ces bactéries par opposition à celles rangées dans la catégorie définie en 2.2. ? Citer

Copyrighted material

deux germes, de genre autre que *Salmonella*, qui appartiennent à ce même groupe.

8. Étude de l'intoxication a *Cl. botulinum*

Une intoxication collective due à *Cl. botulinum* a lieu après une ingestion de jambon cru.

1. Les symptômes caractéristiques amènent à un traitement des malades par sérothérapie.

1.1. Comment s'exerce le pouvoir pathogène de *Cl. botulinum ?*

1.2. En quoi consiste la sérothérapie ? Quel est le but recherché ?

1.3. Actuellement, les sérums antibotuliniques sont obtenus chez le cheval après injection d'une anatoxine. Qu'est-ce qu'une anatoxine ? Quel est son mode d'obtention ?

2. Cinq types sérologiques de *Cl. botulinum* peuvent être rencontrés en France : A, B, C, D et E. Il existe donc autant de sérums spécifiques. Pour éviter les inconvénients d'une injection trop massive de protéines étrangères, on effectue une sérothérapie spécifique. Les restes de l'aliment contaminé servent à l'identification du type de botulisme.

Après broyage dans un diluant approprié et centrifugation, le surnageant obtenu est réparti en 7 fractions de 2 mL dans des tubes numérotés, puis subit les opérations indiquées dans le tableau suivant.

	Tube						
	1	2	3	4	5	6	7
Addition de 0,1 mL de sérum spécifique	Anti-A	Anti-B	Anti-C	Anti-D	Anti-E	–	–
Traitement particulier	30 min à 37 °C	30 min à 37 °C	30 min à 37 °C	30 min à 37 °C	30 min à 37 °C	–	10 min à 100 °C
Injection du contenu de chaque tube à 2 souris	+	+	+	+	+	+	+
Survie des souris au bout de 24 heures	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui

2.1. Justifier le procédé employé et donner son nom.

2.2. Que peut-on en conclure ?

9. Étude du pouvoir pathogène du bacille tétanique

On réalise deux expériences.

– Expérience 1 : on injecte à un cobaye (C_1) par voie sous-cutanée une culture de bacilles tétaniques. L'animal meurt en quelques jours. Après autopsie, on observe des lésions organiques, mais aucun bacille n'est retrouvé en dehors du point d'inoculation.

– Expérience 2 : on injecte à un cobaye (C_2) un filtrat stérile de culture de bacilles tétaniques. L'animal meurt en quelques jours en présentant des symptômes rappelant ceux du tétanos et des lésions voisines de celles observées dans la première expérience.

1. Quelles conclusions peut-on tirer de ces deux expériences ?

2. Quelle est la cause du pouvoir pathogène du bacille tétanique ? Donner ses propriétés.

3. Une personne est atteinte du tétanos. Quel est le traitement utilisé pour combattre la maladie ? Donner son principe ?

10. Vaccinations

Chez l'homme, la vaccination associée antidiphtérique et antitétanique (vaccin DT) suit le protocole suivant : 3 injections, par voie intramusculaire, à 1 mois d'intervalle. Les composants fondamentaux du vaccin sont les suivants :

Composants	Quantités
Anatoxine diphtérique purifiée	1 dose
Anatoxine tétanique purifiée	1 dose
Hydroxyde d'aluminium Al_2O_3	1 mg
Soluté physiologique qsp	0,5 mL

1. Définir les termes vaccination et sérothérapie.

2. Comment transforme-t-on une toxine en anatoxine ?

3. Expliquer les bases physiologiques du procédé utilisé des trois injections successives.

4. Donner dans ce cas la cinétique d'apparition des anticorps lors des différentes injections ? Illustrer la réponse par un graphique.

11. Étude du pouvoir pathogène de *C. diphteriae*

On réalise deux expériences.

– Expérience 1 : l'injection d'une culture de *C. diphteriae* au cobaye entraîne la mort de celui-ci. Le bacille diphtérique n'est retrouvé qu'au point d'inoculation et l'autopsie révèle des lésions caractéristiques des divers organes, en particulier des capsules surrénales hypertrophiées et hémorragiques.

– Expérience 2 : les mêmes lésions sont observées au niveau des organes chez des cobayes auxquels on a injecté du filtrat de culture de *C. diphteriae.*

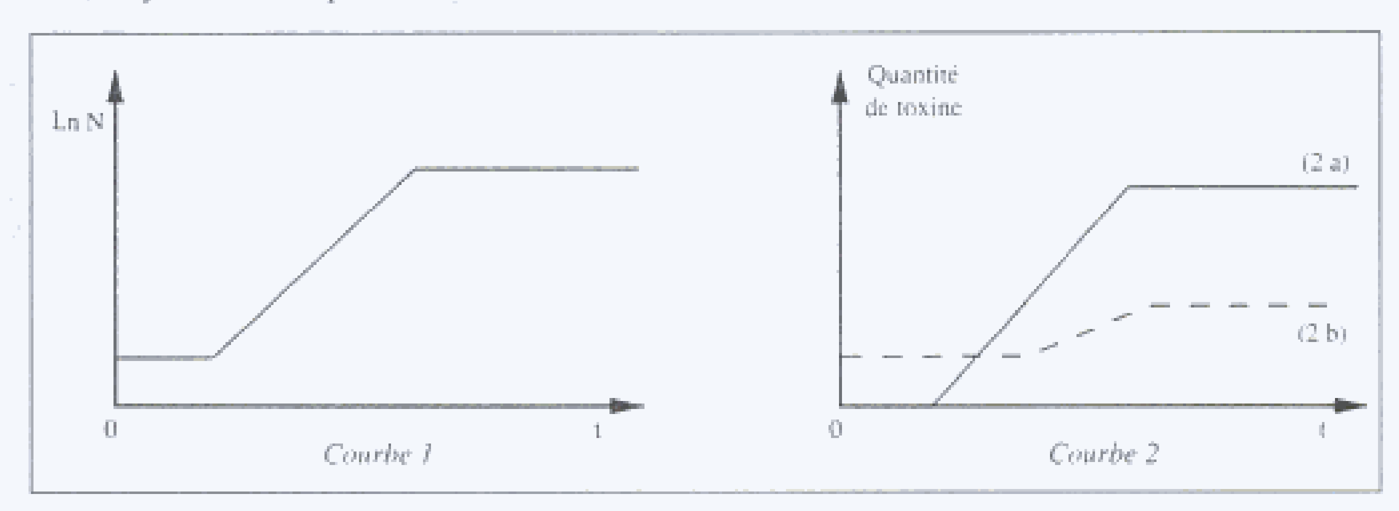
1. Analyser ces deux expériences et conclure.

2. On étudie la croissance du bacille diphtérique en fonction du temps (courbe 1) et on détermine expérimentalement la quantité de toxines synthétisée au cours de cette croissance. Le titrage de la toxine est réalisé à la fois sur le filtrat de culture (courbe 2*a*) et sur les cellules bactériennes (courbe 2*b*).

Les résultats sont schématisés ci-dessous :

– courbe 1, LnN = f(t) ;

– courbe 2, quantité de toxines = *f(t).*



2.1. Commenter l'allure des courbes 2*a* et 2*b*. En déduire le mode de production de la toxine diphtérique.

2.2. À quel type de toxine appartient-elle ? Quelle est sa nature ?

2.3. Quelles sont ses principales propriétés ?

3. Seules les souches de bacille diphtérique infectées par un bactériophage β sont capables de produire cette toxine. Comment s'appelle ce phénomène ? La propriété de produire la toxine est-elle transmissible aux cellules filles ? Justifier la réponse.

12. Étude du pouvoir pathogène de *Y. pestis*

1. Le pouvoir pathogène de *Y. pestis* est dû en partie à deux types de toxines mortelles :

– une toxine protéique (toxine pesteuse) à localisation cytoplasmique et non sécrétée par la bactérie ;

– une toxine lipopolysaccharidique (LPS).

1.1. Qu'est-ce qu'une toxine ?

1.2. On procède aux expériences suivantes :

a) on prélève une partie d'une culture de *Y. pestis* prélevée en phase exponentielle, on filtre et on injecte le filtrat à des rats ;

b) on prélève une partie de la culture toujours en phase exponentielle, on lyse les bactéries, on filtre et on injecte le filtrat à un second lot de rats ;

c) on prélève une partie de la culture encore en phase exponentielle, on réalise un extrait de paroi purifiée et on l'injecte à un troisième lot de rats.

Quel est le résultat obtenu pour chaque expérience ? Justifier.

2. Des prélèvements de culture de *Y. pestis* en phase de latence, en phase exponentielle et en phase stationnaire sont inoculés à d'autres lots de rats. Les animaux meurent d'autant plus tardivement que le prélèvement a été précoce. Dans tous les cas, l'autopsie montre la présence de bactéries dans tous les tissus.

Proposer une interprétation des résultats.

13. Étude du pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes*

1. *Listeria monocytogenes* est considérée comme une bactérie pathogène opportuniste. Définir ce terme.

2. *Listeria monocytogenes* est une bactérie invasive. Elle se multiplie à l'intérieur de nombreuses cellules, en particulier dans les macrophages.

2.1. Définir le pouvoir invasif d'une bactérie.

2.2. Citer les facteurs liés à la bactérie, favorisant le pouvoir invasif.

2.3. Par quel mécanisme les macrophages interviennent-ils dans la défense antibactérienne non spécifique de l'organisme ? Expliquer.

CORRIGÉS

1. Compléter

1. Symbiose, parasitisme.

2. Saprophytes, BPO, bactéries pathogènes opportunistes, BPS, bactéries pathogènes systématiques.

3. *Fimbriae*, adhésines, glycolalyx.

4. Toxines protéiques, exotoxines vraies.

5. Immunogène, toxines, chaleur, formol, anatoxines.

6. Généralisée, septicémie, bactériémie.

7. Toxi-infections, intoxinations.

8. Contact direct, morsures ou piqûres, hôte vecteur.

9. Vaccination, immunité active, sérothérapie, passive, préventive, curative.

10. Sérothérapie, homologues, de la même espèce, hétérologues, d'espèces différentes, choc anaphylactique.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Vrai.

2. Faux : la DL_{50} représente la dose pour laquelle 50 % du lot d'animaux cobayes est mortellement atteint (cela induit une notion statistique). La DMM est la dose minimale capable de provoquer la mort de tous les animaux traités (pas de connotation statistique).

3. Faux : certaines toxines protéiques ne peuvent être qualifiées d'exotoxines vraies car elles ne sont libérées que lors de la mort cellulaire.

4. Vrai.

5. Vrai.

6. Faux : dans la toxi-infection, le germe se développe sur l'hôte et y libère la toxine. Pour l'intoxination, seule la toxine entre en contact avec l'hôte.

7. Faux : il s'agit d'une infection lors de laquelle le germe responsable possède à la fois un certain pouvoir invasif et une action toxique.

8. Faux : ils sont préparés à partir de toxines traitées par le formol et la chaleur, les anatoxines, et qui ont ainsi conservé leur pouvoir immunogène tout en ayant perdu leur activité toxique.

9. Vrai.

10. Faux : un sérum non homologue (hétérologue) peut provoquer une réaction de l'organisme (allergie) pouvant être très grave (choc anaphylactique) par le fait qu'il est immunologiquement étranger.

3. Pouvoir pathogène du bacille botulinique

1. Saprophytisme : « vie sur des matières en décomposition », développement dans l'environnement de l'homme ou sur l'homme. Symbiose : « vie avec », relation profitable et nécessaire aux deux (rumen). Parasitisme : profite à la bactérie et est néfaste à l'hôte (voir chap. VII, § 2.1).

2. Flore saprophyte du sol. Flore aéro-anaérobie ou anaérobie stricte, très résistante et sporulante. Pouvant contaminer des produits alimentaires et difficilement éliminable par une simple stérilisation (spores).

3. Culture en milieu anaérobie (gélose profonde, jarre anaérobie ; voir chap. III, § 1.4.3. et 4.2.3). Milieux enrichis en substances réductrices.

4. Intoxination. Toxine sécrétée agissant sur les fibres nerveuses. En fait elle l'est en partie en phase exponentielle de croissance, le reste étant libéré après autolyse de la bactérie. Cette toxine est thermolabile et donc facilement détruite par simple cuisson.

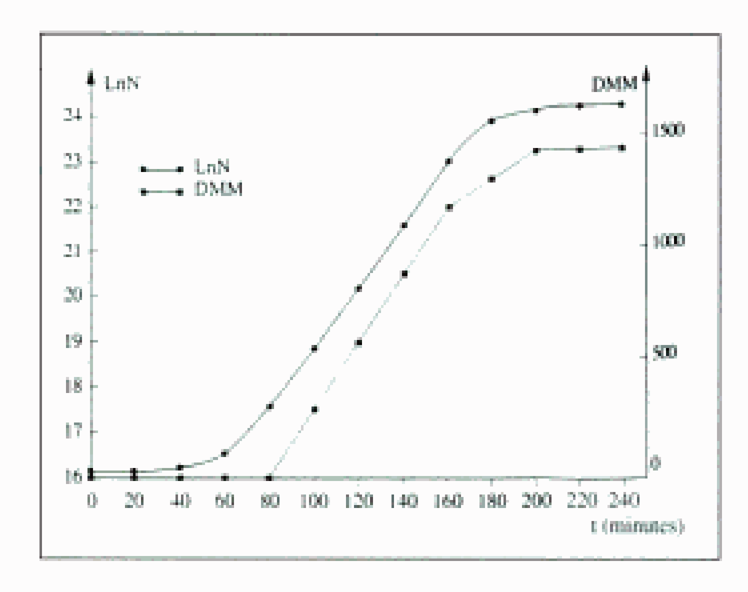
5. Vaccination : immunisation active par administration de l'antigène contre lequel l'organisme va élaborer des anticorps et des cellules spécialisées ; protection efficace, à durée longue surtout si l'on pratique des rappels. Sérothérapie : immunisation passive par administration d'anticorps présents dans le sérum d'une autre malade ou d'un animal ; risque de réaction immunitaire importante et protection limitée dans le temps (voir chap. VII, § 4).

4. Étude de la production de toxines

1. Dose minimale tuant dans un délai déterminé des animaux de race, de poids et d'âge déterminé.

2. Injection de différentes doses de toxines à des lots d'animaux répondant aux caractères indiqués en réponse 1 et évaluation des survivants et des morts.

3. Courbes (voir ci-dessous). On constate que la production de toxine ne démarre que lorsque la culture est en phase exponentielle pour être ensuite produite proportionnellement en fonction du temps et être maximale en phase stationnaire. La courbe suit l'évolution de la croissance avec un décalage dans le temps de 20 minutes environ. Il s'agit d'une exotoxine libérée par la cellule, exotoxine « vraie ».



Copyrighted material

5. Étude du pouvoir pathogène de *St. aureus*

1. Septicémie : infection généralisée (voir chap. VII, § 3.6.2).

2. Réaction inflammatoire de l'endothélium veineux et colonisation de la paroi veineuse → caillot (voir chap. VII, § 3.6.2 et fig. VII-15).

3. Coagulase, hyaluronidase (voir chap. VII, § 3.6.3.3).

4. Recherche de la coagulase : à partir d'une culture en milieu liquide de staphylocoque, on réalise un mélange volume à volume avec du plasma oxalaté et l'on incube à 37 °C. On observe la coagulation du plasma qui doit apparaître après une durée de 30 minutes à quelques heures pour permettre de diagnostiquer *St. aureus*.

6. Étude du pouvoir pathogène de *S. typhi*

1.1. Au temps t_3, on est en présence d'un nombre de bactéries maximum (phase stationnaire). Au temps t_4, même si le nombre de bactéries est inférieur à t_2, en fait il subsiste le reste des bactéries mortes (phase de déclin) et donc les endotoxines.

1.2. Les cellules aux temps t_1 et t_2 ayant été traitées par les ultrasons, elles ont été détruites et les endotoxines ont été libérées.

2. Effet peu intense car les endotoxines restent liées à la cellule et ne sont pas libérées dans le milieu. Seul le pouvoir invasif des bactéries joue alors un rôle.

3. L'endotoxine est liée au corps bactérien (voir chap. II, § 2.2.3.3.2 et chap. VII, § 3.4.1.2).

4. Endotoxine de nature glucido-lipido-protéique (voir chap. II, § 2.2.3.3.2).

5. Propriétés pathogène (lipide A) et antigénique (antigène O) du LPS (voir chap. II, § 2.2.3.3.2). *E. coli* GEI.

6. Différentes dilutions de la substance sont mises en présence de lots d'animaux. On détermine pour chaque lot le pourcentage de survivants et de morts. DMM (dose minimale mortelle), DL_{50} % (dose létale 50 %), voir chap. VII, § 3.2. Valeurs nettement inférieures à celles trouvées en présence de toxine tétanique, rapport de 1 à 700 000 en moyenne (voir chap. VII, § 3.4.1.2, tab VII-5).

7. Étude du pouvoir pathogène de *Str. pneumoniae*

1.1. Pouvoir pathogène : propriété d'un micro-organisme de déclencher, chez son hôte, des troubles physiologiques.

1.2. C'est le pouvoir invasif (virulence) de la souche A qui a joué un rôle essentiel. Se multipliant et se disséminant partout, elle a envahi tous les organes. Ce pouvoir lui permet de se disséminer et de se multiplier rapidement en résistant en même temps à la phagocytose (voir chap. VII, § 3.3).

1.3. Calque d'organe souris A : abondance de cocci à Gram positif en diplocoques parmi les cellules de l'organe et d'une grande quantité de leucocytes. Gram sur suspension B, diplocoques à Gram positif.

1.4. Par exemple *K. pneumoniae*.

1.5. Par exemple fibrinolysine de *St. aureus* détruisant les caillots de fibrine, obstacles à sa dissémination, DNase du même germe détruisant les cellules et provoquant des lésions tissulaires (voir chap. VII, § 3.3.1.3).

2.1. Flore commensale : flore bactérienne normalement résidante de l'intestin (« manger à la même table », voir chap. VII, § 2.1.3.). Infection primaire : infection responsable des premiers symptômes par opposition à la surinfection. Terrain : environnement physiologique, physico-chimique et microbiologique de l'hôte (santé, pH local, température locale, flore résidante…). Sujets immunologiquement déficients, malades, saison froide.

2.2. BPO : bactéries pathogènes opportunistes (voir chap. VII, § 2.1.3).

3. BPS : bactéries pathogènes spécifiques (voir chap. VII, § 2.1.3). *V. cholerae*, *Y. pestis*.

8. Étude de l'intoxication à *Cl. botulinium*

1.1. Élaboration et sécrétion d'une exotoxine agissant sur les cellules nerveuses.

1.2. Administration à un malade d'anticorps provenant d'un sérum d'un autre malade ou d'un animal. Protection immédiate lorsque l'infection est déjà déclarée. Mais immunité passive et de courte durée.

1.3. Anatoxine : toxine traitée de manière à conserver ses propriétés antigéniques tout en ayant perdu ses propriétés toxiques. Traitement au formol et à la chaleur (voir chap. VII, § 3.4.2.1.4.).

2.1. Tubes 1 à 5 : essais, mises en présence du filtrat censé contenir la toxine avec chacun des 5 sérums spécifiques. Le tube où les anticorps neutraliseront la toxine ne provoquera plus rien chez l'animal inoculé. Tube 6 : témoin positif sans anticorps. Tube 7 : témoin négatif, la toxine chauffée est détruite (thermolabilité).

2.2. Dans le cas présent, c'est le tube 2 qui laisse l'animal en vie ; donc la souche responsable est la souche B.

9. Étude du pouvoir pathogène du bacille tétanique

1. La pathogénicité est due à une substance chimique élaborée et excrétée par la bactérie. Le pouvoir invasif du germe est inexistant.

2. Cette substance est une toxine excrétée : une exotoxine. Elle est fortement toxique et antigénique. C'est une substance thermolabile (voir chap. VII, § 3.4.1.1).

3. Sérothérapie. Administration d'un sérum contenant des anticorps destinés à neutraliser la toxine tétanique. Ce sérum provient d'un animal immunisé ou d'un autre malade. Cela assure une protection curative rapide et immédiate mais en aucun cas une protection à long terme (voir chap. VII, § 4.2).

10. Vaccinations

1. Vaccination : immunisation active par administration de l'antigène contre lequel l'organisme va élaborer des anticorps

Copyrighted mater

et des cellules spécialisées ; protection efficace, de durée longue surtout si l'on pratique des rappels. Sérothérapie.

2. Traitement à la chaleur et au formol (procédé de Ramon) : culture à 40 °C, pH de 7,8 à 8 ou 5,5 en présence de formol pendant 3 à 5 semaines (voir chap. VII, § 3.4.2.4).

3. Procédé du rappel : hyperimmunisation pour augmenter le taux d'anticorps et la durée de vie des cellules mémoires (voir chap. VII, § 3.5.2).

4. Courbe (voir chap. VII, fig. VII-14).

11. Étude du pouvoir pathogène de *C. diphteriae*

1. Pathogénicité uniquement due à une substance chimique (toxine) élaborée et sécrétée par la bactérie.

2.1. On constate que la toxine est produite et sécrétée dès que le germe se trouve en phase exponentielle de croissance, pour atteindre son maximum lorsqu'il se trouve en phase stationnaire.

2.2. Il s'agit d'une exotoxine « vraie » de nature protéique (voir chap. VII, § 3.4.1.1).

2.3. Toxicité en antigénicité importante, thermolabilité.

3. La conversion lysogénique. Non : le caractère est porté par le bactériophage et n'est jamais intégré au génome bactérien (voir chap. VI, § 3.4.3).

12. Étude du pouvoir pathogène de *Y. pestis*

1.1. Molécule protéique ou lipopolysaccharidique, synthétisée par la bactérie et responsable de la pathologie infectieuse par son action sur une cible particulière (structure cellulaire, métabolisme…).

1.2. a) La toxine protéique étant exocytée en phase exponentielle, on va donc la récupérer dans le filtrat de culture. Si la concentration est suffisante → mort des animaux.

b) La toxine protéique totale est récupérée dans le filtrat → mort des animaux.

c) La toxine LPS est récupérée dans l'extrait da paroi purifiée → mort des animaux.

2. Deux phénomènes jouent en concomitance : le pouvoir invasif ; les bactéries étant de plus en plus nombreuses, il augmente avec le temps, la dissémination est plus importante. La quantité de toxines synthétisées et libérées qui augmente elle aussi avec le nombre de bactéries et l'âge de la culture. En phase stationnaire le nombre de bactéries est maximal et la quantité de toxines libérées aussi.

13. Étude du pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes*

1. Germe qui se développe très facilement dans des organismes déficients.

2.1. Faculté de se multiplier et de se disséminer dans l'organisme infecté.

2.2. La présence sur la bactérie de *pili* (ou *fimbriae* de type 1) permettant sa fixation-adhésion aux tissus (agglutination) grâce à des lectines. La présence d'antigènes d'adhésion (adhésines), molécules protéiques correspondant au *fimbriae like* (Ag K chez *E. coli*). Le glycocalyx, fibres polysaccharidiques adhérant aux membranes cellulaires. La résistance à la phagocytose (présence de capsule, non-digestion par les macrophages). Faculté de produire des enzymes favorisant l'extension du foyer infectieux (coagulase, fibrinolysine, hyaluronidase, désoxyribonucléase chez *St. aureus*).

2.3. La phagocytose : chimiotactisme attirant les bactéries, phase d'adhésion à la membrane du macrophage, phase d'ingestion (la bactérie est englobée dans un phagosome), phase de digestion de la bactérie (lysosome, phagolysosome).

Copyrighted material

Chapitre 8

Virologie

En 1892, **Ivanowsky** montrait qu'une maladie atteignant les plants de tabac, la mosaïque du tabac, était due à un agent inconnu n'appartenant ni au monde des bactéries, ni aux poisons chimiques. Cet agent infectieux, capable de reproduire la maladie après inoculation à un plant de tabac sain, capable aussi de traverser les filtres qui retiennent habituellement les bactéries, fut appelé « ultravirus » ou « virus filtrant ». Par la suite, il fut démontré que de nombreuses autres maladies animales ou végétales pouvaient être engendrées par des agents infectieux analogues. Le critère de filtration reconnu comme fondamental pour les distinguer des bactéries ne pouvait être retenu comme la seule propriété caractéristique, c'est pourquoi on leur conserva plus simplement le nom « virus » qui désignait autrefois les germes pathogènes quels qu'ils fussent.

Les bactériologistes qui étudièrent les premiers ces agents eurent tendance à les opposer ou à les rapprocher des bactéries. C'est ainsi qu'ils leur reconnurent un pouvoir infectieux, un pouvoir filtrant, de faibles dimensions et, enfin, une inaptitude à se multiplier sur les milieux de culture propres aux bactéries. Les virus sont en effet des parasites obligatoirement intracellulaires.

Il fallut attendre de nombreuses années pour que soient reconnues la nature véritable des virus et leurs propriétés exceptionnelles. En 1949, Enders montre que les virus peuvent être cultivés sur cellules. Dès lors la virologie connaît un prodigieux essor. Les méthodes de culture en masse permettent en particulier de récolter de grandes quantités de virus et de les étudier sous leurs aspects physiques et chimiques.

L'ensemble des travaux tend alors à montrer que les virus, quelle que soit leur origine, ont tous en commun un certain nombre de caractères.

– En 1953, Lwoff donne une définition de la particule virale, ou **virion**, qui est maintenant universellement adoptée :

– le virion ne possède qu'**un seul type d'acide nucléique** : soit de l'acide ribonucléique (ARN), soit de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ;

– le virion **se reproduit** à partir de son seul acide nucléique ;

– le virion est **incapable de se diviser** ;

– le virion n'a **aucune information génétique** concernant les enzymes du métabolisme intermédiaire producteur d'**énergie** ;

– la multiplication des virions implique l'**utilisation des structures** de la cellule hôte et, spécialement, des ribosomes.

– Le virion manifeste donc un **parasitisme absolu**.

Cette définition distingue nettement les virus des bactéries.

Copyrighted mater

1.2. Éléments de structure

Le virion T, en tant que particule infectieuse, est constitué d'une molécule d'acide nucléique associée souvent à des protéines internes et protégée par une coque rigide de nature protéique : la **capside**. On donne souvent à cet ensemble le nom de **nucléocapside.** La capside peut être nue ou entourée d'une **enveloppe**, ou **péplos**.

1.2.1. Acide nucléique

Il peut être de l'**ADN** ou de l'**ARN**.

L'acide nucléique viral est **infectieux**. Il représente le génome viral. Le rapport (G + C)/(A + T) varie de 35 à 75 %. Il peut être circulaire, non segmenté ou segmenté.

Sous forme désoxyribonucléique, il est généralement bicaténaire et de structure comparable à celle définie par Watson et Crick. Il est le plus souvent linéaire, rarement circulaire *(Papovavirus)*. Après l'infection, l'ADN nucléaire peut prendre une forme circulaire. Cette « circularisation » peut être un préalable indispensable à l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome cellulaire comme on le verra dans le cas du phage λ et d'*E. coli* K_{12}.

La masse molaire de cet ADN varie de 10^6 daltons avec les petits virus comme celui du polyome à 160.10^6 daltons avec les gros virus du type *Pox*. La longueur de cette molécule varie, en conséquence, de quelques milliers à plus de 250 000 nucléotides ; le nombre de gènes peut être évalué, comparativement, de 10 à plusieurs centaines.

Sous forme ribonucléique, il est habituellement monocaténaire, exception faite de quelques virus dont les plus connus sont les réovirus. Il contient, comme l'ADN, l'information génétique virale. Cet ARN est presque toujours linéaire et continu mais il peut aussi être segmenté. Sa masse molaire est plus faible que celle de l'ADN : elle varie de 10^6 daltons (phages à ARN) à 15.10^6 daltons (réovirus). L'orientation peut être **positive** (du même sens qu'un ARN messager) ou **négative** (complémentaire à un ARNm).

Certains virus possèdent, étroitement associées au génome, des protéines internes constituant avec lui le **nucléoïde**, ou core, et des enzymes comme la transcriptase qui transforme l'ARN viral en ARN messager infectieux (myxovirus).

1.2.2. Capside

C'est une véritable boîte ou coque de nature protéique qui entoure et protège l'acide nucléique viral. L'analyse chimique a montré que la faible quantité d'acide nucléique viral était insuffisante pour coder de nombreux types de protéines. De ce fait, la capside est constituée par l'**assemblage d'unités identiques** entre elles que l'on appelle **unités de structure**. L'édification de ces unités de structure ne peut se réaliser que selon deux types de symétries : la **symétrie hélicoïdale** et la **symétrie cubique**.

1.2.3. Enveloppe

Tous les virus à symétrie hélicoïdale sont entourés d'une **enveloppe**, ou **péplos**, ainsi que quelques virus à symétrie cubique. Cette enveloppe, qui prend naissance au cours de la traversée des membranes cellulaires, présente une constitution complexe : elle est formée d'éléments cellulaires et d'éléments d'origine virale. On y rencontre des protéines, des glucides et, surtout, des lipides qui déterminent chez ces types de virus une certaine sensibilité aux solvants organiques et en particulier à l'éther. Le péplos est, à l'image de la capside, formé de l'assemblage d'unités de structure ou **péplomères** dont les propriétés **antigéniques** de surface sont importantes, déterminant en particulier la reconnaissance des cellules sensibles et jouant un rôle dans la maturation et la libération du virus.

1.3. Architecture et assemblage

L'assemblage nucléo-capsidal ne se fait pas sans ordre ni sans harmonie. Il obéit à des lois précises et détermine deux types de symétries architecturales chez le virion : les symétries cubique et hélicoïdale.

Copyrighted material

1.3.1. Virus à symétrie cubique

La structure de ces virus dérive de l'**icosaèdre** *(fig. VIII.1)*. La capside comporte 20 faces (chaque face étant représentée par un triangle équilatéral), 12 sommets et 30 arêtes. Elle possède 3 types de symétries :

– 15 axes de symétrie d'ordre 2 passant par les centres des arêtes ;

– 10 axes de symétrie d'ordre 3 passant par les centres des faces triangulaires ;

– 6 axes de symétrie d'ordre 5 passant par les sommets.

La capside contient l'acide nucléique pelotonné ou enroulé sur lui-même, mais il ne semble pas y avoir d'association étroite entre acide nucléique et protéines. Elle est formée d'un certain nombre d'unités morphologiques, les **capsomères**, disposés régulièrement et comprenant eux-mêmes des sous-constituants, les unités de structure. Certains capsomères, les plus nombreux, comprennent 6 unités de structure : ce sont des prismes hexagonaux creux ou **hexamères** distribués sur les arêtes et sur les faces (**hexons**). D'autres contiennent 5 unités de structure et forment des prismes pentagonaux creux, ou **pentamères**, situés à chaque sommet de l'icosaèdre (**pentons**).

Le nombre de capsomères est exprimé par la formule :

$$N = 10\,(n - 1)\,2 + 2$$

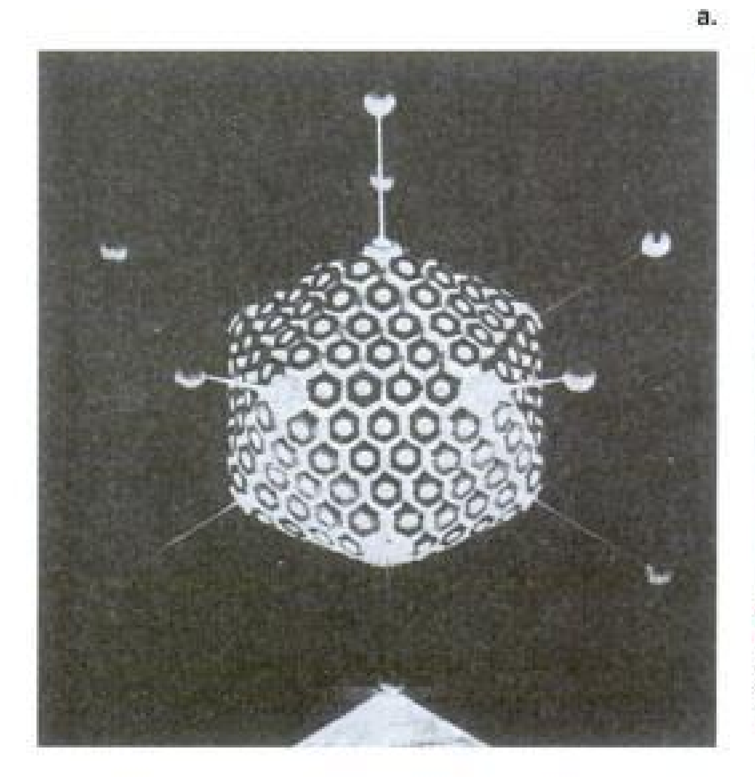
dans laquelle N représente le nombre total de capsomères et n le nombre de capsomères disposés sur un côté de chaque triangle équilatéral, y compris les capsomères des extrémités. Un certain nombre de virus se conforment à cette formule, comme l'illustre le tableau ci-dessous.

	n	N
Phage (Φx 174)	2	12
Réovirus	4	92
Virus herpétique	5	162
Adénovirus	6	252

Dans le cas des adénovirus, on décèle 252 capsomères, dont 240 hexamères et 12 pentamères, situés aux sommets de l'icosaèdre. Il existe, en outre, sur ces pentamères de sommet, 12 molécules protéiques ayant l'aspect de battants de cloche et parfaitement visibles au microscope électronique. Ce sont des fibrilles de 20 nm de longueur terminées par une sphère de 4 nm de diamètre et possédant une activité hémagglutinante.

Cette formule pratique ne peut malheureusement rendre compte de la structure de tous les virus.

a.



b.

p

h

Figure VIII.1 – **Symétrie cubique chez les Adénovirus.**

a : schéma structural : capsomères et molécules en « battants de cloche » ; b : coloration négative ; p. pentamères, h. hexamères.

Copyrighted material

Elle apparaît, en microscopie électronique, régulièrement parsemée de projections ou spicules de 8 à 10 nm de longueur. Cette enveloppe phospholipidique intègre un certain nombre d'éléments d'origine cellulaire. Les spicules qui lui donnent un aspect hérissé sont de deux types :

– les **hémagglutinines**, de nature glycoprotéinique, qui sont des bâtonnets de 14 nm de longueur insérés dans l'enveloppe par leur pôle lipophile. Elles possèdent des sites de reconnaissance assurant la fixation des hématies au niveau de leurs récepteurs spécifiques de nature mucoprotéique. Ces spicules responsables du phénomène d'hémagglutination sont en nombre élevé (environ 2 000) ;

– les **neuraminidases**, qui se présentent également sous forme d'unités, ou monomères, fixées sur l'enveloppe. Au nombre de 500 à 1 000, leur action enzymatique permet l'hydrolyse de l'acide neuraminique, récepteur cellulaire. Elles interviennent donc en permettant l'élution ou la libération des virus.

1.4. Classification et nomenclature

Les éléments de structure qui viennent d'être décrits autorisent une classification appelée **système LHT** (du nom de ses promoteurs, Lwoff, Horne et Tournier) *(tab. VIII.1)*. Elle retient principalement :

– au niveau de l'acide nucléique :

- sa nature, ribonucléique **(R)** ou désoxyribonucléique **(D)**,
- le nombre de brins, simple **(SB)** ou double **(DB)**,
- pour les SB, l'orientation, positif (+) (du même sens qu'un ARN messager) ou négatif (–) (complémentaire à un ARNm),
- la structure et l'organisation du génome, circulaire **(cir)**, non segmenté **(n-seg)**, segmenté **(seg)** ;

– au niveau de la morphologie :

- le type de symétrie, cubique **(C)** ou hélicoïdale **(H)** avec, selon ce type, le nombre de capsomères dans le 1er cas, le diamètre de l'hélice dans le second,
- la présence d'une enveloppe **(E)** ou l'absence (**N** = nu).

Quelques exemples vont permettre d'illustrer les principaux cas des 74 familles et des groupes dont 21 sont capables d'infecter des vertébrés (le 22e groupe comporte les virus non classés).

1.4.1. Virus à ARN

1.4.1.1. Nucléocapside hélicoïdale enveloppée

Les *Orthomyxoviridae* sont des virus à ARN segmenté, de symétrie hélicoïdale, entourés d'une enveloppe hérissée de spicules (hémagglutinine et neuraminidase). Leur diamètre est de 100 nm environ. Le diamètre de leur hélice est de 9 nm. Le *Myxovirus influenzae* est responsable, chez l'homme, de la grippe, infection aiguë et épidémique.

Les *Paramyxoviridae,* de dimensions plus grandes que les précédents (de 100 à 300 nm) et dont l'hélice a un diamètre de 18 nm, comprennent les virus de la rougeole, des oreillons et le virus respiratoire syncytial.

Le virus de la rage en est le principal représentant parmi les *Rhabdoviridae*. Il a une forme en obus et des dimensions importantes (de 75 à 175 nm). Sa nucléocapside est une hélice monocaténaire d'ARN de 15 nm de diamètre.

1.4.1.2. Nucléocapside hélicoïdale nue

Le principal représentant des *Tobamoviridae* est le virus de la mosaïque du tabac (voir § 1.3.2.1.).

1.4.1.3. Nucléocapside icosaédrique enveloppée

Les *Togaviridae,* anciennement dénommés *Arbovirus* en raison de leur mode de transmission par les arthropodes *(arthropod born virus),* forment un groupe complexe de plus de 250 virus. Ils sont petits (40 nm) et contiennent surtout des lipides. Parmi les espèces pathogènes pour l'homme, il faut citer les agents de la fièvre jaune, de la dengue, les agents de nombreuses encéphalites (japonaise, équine de l'Est, de l'Ouest, Saint-Louis, etc.) et, surtout, le virus de la rubéole qui détermine des embryopathies chez les mammifères.

Copyrighted material

Tableau VIII.1 – Classification des virus.

Acide nucléique				Enveloppe	Symétrie de la capside	Familles virales (-*viridae*)	Exemples de virus
Type	Brins	Orientation	Structure				
ADN	SB	+ ou –	n-seg	N	C	*Parvo-*	
ADN	SB/ DB		cir	E	?	*Hépadna-*	hépatite B
ADN	DB		cir	N	C	*Papova-, Adéno-*	
ADN	DB		n-seg	E	C	*Herpes-*	herpès, varicelle
ADN	DB		n-seg	E	complexe	*Pox-*	variole, vaccine
ADN	DB		n-seg	N	C	*Irido-*	
ARN	SB	+	n-seg	N	C	*Picorna-, Cailci-*	Poliovirus, hépatite A
ARN	SB	+	n-seg	E	C	*Toga-*	rubéole
ARN	SB	+	n-seg	E	H	*Corona-*	
ARN	SB	–	n-seg	E	H	*Rhadbo-Filo-Paramyxo-*	rage, oreillons, rougeole
ARN	SB	–	seg	E	H	*Orthomyxo-*	grippe
ARN	SB	+/–	seg	E	H	*Bunya-, Aréna-*	
ARN	DB		seg	N	C	*Reo-, Birna-*	réovirus
ARN → ADN	SB	+	n-seg	E	H	*Rétro-*	VIH

SB : simple brin ; DB : double brin ; n-seg : non-segmenté ; seg : segmenté ; cir : circulaire ; N : non-enveloppé ; E : enveloppé ; C : cubique ; H : hélicoïdale ; ARN → ADN : virus à ARN impliquant une phase ADN dans leur cycle de réplication.

1.4.1.4. Nucléocapside icosaédrique nue

Les *Picornaviridae* sont de petits virus à symétrie cubique (diamètre moyen : 28 nm) non enveloppés, contenant de l'ARN et résistants à l'éther. Le chlorure de magnésium les stabilise et les rend plus thermorésistants.

Le groupe des *Picornaviridae* comprend :

– les poliovirus, responsables de la poliomyélite paralytique ;

– les virus Coxsackie, à l'origine de syndromes plus ou moins sévères, responsable de méningites lymphocytaires et de syndromes digestifs et respiratoires banals ;

– les rhinovirus, isolés des sécrétions rhinopharyngées et provoquant le rhume de cerveau ;

– les *Reoviridae*, importants sur le plan taxinomique mais qui le sont moins sur le plan médical, provoquant surtout des rhino-pharyngites, des pneumopathies, des gastro-entérites (rotavirus) et des éruptions cutanées, exceptionnellement des méningites. À signaler leur ARN bicaténaire.

Copyrighted material

1.4.2. Virus à ADN

1.4.2.1. Nucléocapside hélicoïdale enveloppée

Les *Poxviridae* sont de gros virus (300 nm de long) de forme parallélépipédique (200 × 300 × 100 nm) présentant une structure complexe : un corps central ayant la forme d'un disque biconcave contient un triple élément constitué de nucléoprotéines ; de chaque côté de ce disque se situent deux masses latérales ; l'ensemble est entouré d'une double membrane.

Le groupe comprend les virus de la variole, de la vaccine *(fig. VIII.3)* et du *cow-pox*.

1.4.2.2. Nucléocapside icosaédrique enveloppée

• Les ***Herpes viridae*** *(fig. VIII.4)*. Ils se présentent sous forme de particules contenant de l'ADN, à symétrie cubique, entourées d'une enveloppe. Le virion nu a un diamètre de 100 nm. Il possède 162 capsomères. Le groupe comprend 4 virus importants en pathologie humaine :

– les virus de l'herpès humain comportant 2 types (1 et 2) ;

– le virus de la varicelle et du zona ;

– le virus de la maladie des inclusions cytomégalique ;

– le virus d'Epstein-Barr qui est responsable de la mononucléose infectieuse, du lymphome de Burkitt et de cancers du nasopharynx.

• Les **virus des hépatites**. On distingue l'hépatite infectieuse dite A, transmise d'homme à homme et prenant fréquemment une allure épidémique (son agent un hépatovirus de la famille des *Picornaviridae*), l'hépatite sérique dite B, transmise principalement par le sang ou ses dérivés. Le virus de l'hépatite B se présente sous trois formes : des sphères de 20 nm de diamètre, des tubules atteignant 250 nm de long et des particules décrites par Dane, considérées comme les formes infectieuses complètes. C'est un virus à ADN enveloppé de la famille des *Hepadnaviridae* comportant un génome ayant des portions d'ADN double et simple brins. L'agent de l'hépatite C est un *Flaviviridae* (à ARN). Comme on le voit, les hépatites ont pour origine des agents infectieux très variés.



Figure VIII.3 – **Coupe d'un virion du virus de la vaccine dans le cytoplasme d'une cellule infectée.**

Noter le système complexe d'enveloppes périphériques du virion, et la forme biconcave de son corps central. G = 60 000 x. *(Cliché : A. Kirn, Strasbourg).*

1.4.2.3. Nucléocapside icosaédrique nue

Les *Papovaviridae*, de 45 à 55 nm de diamètre, comportent 72 capsomères. Les principaux représentants de ce groupe possèdent un pouvoir oncogène. Le virus du polyome se manifeste dans des conditions expérimentales précises vis-à-vis d'animaux de laboratoire comme les souriceaux, les hamsters et les rats inoculés dans les premiers jours de leur existence. Le virus du papillome de Shope est responsable de papillomes cutanés, c'est-à-dire de tumeurs bénignes apparaissant chez le lapin sauvage d'Amérique. Le virus SV 40 fait également partie de ce groupe.

Les *Adenoviridae* *(fig. VIII.5)* à symétrie cubique, contenant de l'ADN, ont une taille moyenne de 60 à 85 nm. Ils n'ont pas d'enveloppe péricapsidale et sont constitués par 252 capsomères. Appelés autrefois virus APC (adéno-pharyngo-

Copyrighted material



Figure VIII.4 – Virus Herpès simplex : bourgeonnement, x 90 000.
(INSERM, Institut Pasteur de Lille, Dr G. Torpier).

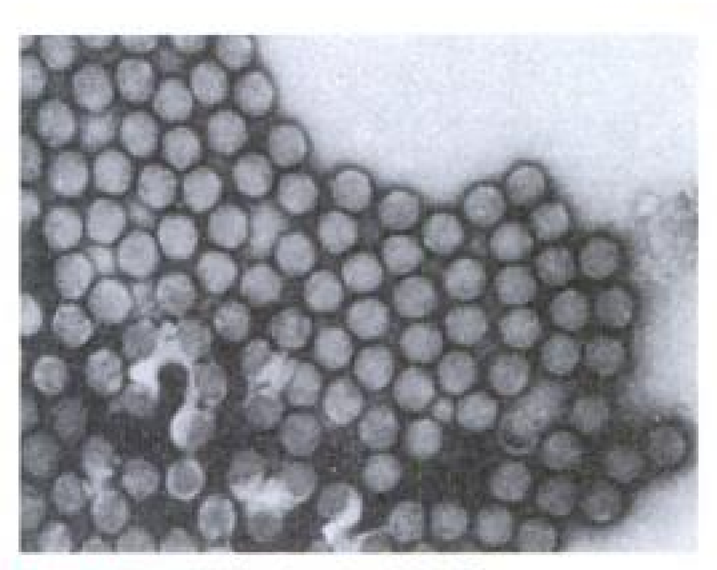


Figure VIII.5 – Adénovirus 5. x 200 000.
(INSERM, Institut Pasteur de Lille, Dr G. Torpier).

conjonctivaux), ils sont responsables de conjonctivites, de pharyngo-conjonctivites et, plus rarement, d'infections respiratoires traduisant leur affinité pour le tissu lymphoïde. Expérimentalement, ils induisent pour la plupart la formation de tumeurs chez les rongeurs.

1.4.3. Virus non classés

Certains virus des hépatites non A non B et le virus de Norwalk (cause de diarrhées) sont quelques-uns des virus qui n'ont pas encore été classés. L'agent de l'encéphalite spongiforme (maladie de Creutzfeldt-Jakob), appelé prion, semble difficile à classer dans les virus.

2. Interactions virus-cellules

2.1. Virus et cellules animales

Du fait de leur parasitisme absolu, les virus ne peuvent se multiplier qu'au sein même des cellules vivantes, par réplication de leur acide nucléique. C'est en fait l'**interaction** du génome viral et de la cellule qui aboutit à la production de nouveaux virions *(fig. VIII.6)*.

Cependant, l'infection d'une cellule par un virus ne conduit pas obligatoirement à la multiplication de ce dernier mais, parfois, à des formes de résistance ou de masquage (par exemple provirus).

2.1.1. Interactions virus-cellules

2.1.1.1. Permissivité

La cellule **permissive** permet le déroulement intégral du programme de réplication du virus. Cette propriété est essentiellement fonction du génotype de la cellule et de son état de différenciation. Une cellule **non permissive**, tout en permettant l'expression de quelques gènes viraux, ne permet pas le déroulement d'un cycle de multiplication (l'infection est **abortive**). Une cellule est **résistante** si elle ne peut être infectée (en général par absence de récepteur pour le virus).

Copyrighted material

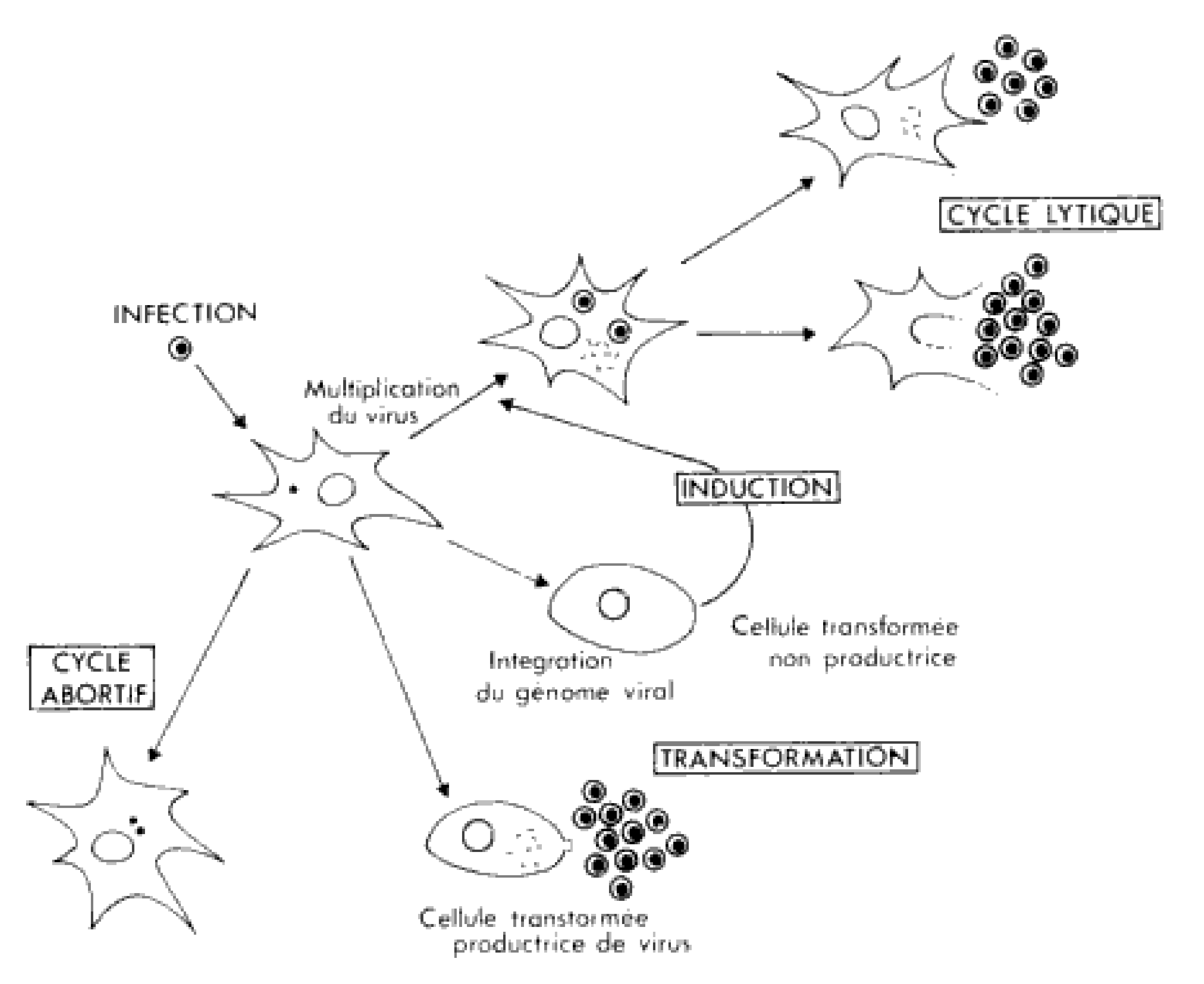


Figure VIII.6 - Principaux types d'interaction virus-cellules.

2.1.1.2. Interaction productive

La pénétration d'un virion ou d'une molécule d'acide nucléique viral dans la cellule conduit à la formation et à la libération de nouveaux virions. Dans la plupart des cas, la cellule infectée est lysée, c'est le **cycle lytique**. Dans d'autres cas (par exemple rétrovirus), il y a multiplication sans mort cellulaire, c'est le **cycle végétatif** ou productif.

2.1.1.3. Interaction abortive

Dans certaines circonstances, l'infection d'une cellule par un virus n'aboutit pas à la production de nouveaux virions ; le **cycle** est **abortif**. La cellule ne permet pas le développement complet du cycle de multiplication : elle est dite non permissive (par exemple adénovirus sur cellules de singe).

2.1.1.4. Interaction intégrative

Avec d'autres virus, l'interaction conduit à une liaison **intégrative** et stable du matériel génétique viral à celui de la cellule. Dans ce cas, le virus persistera dans la cellule et sera transmis à toute sa descendance. Cette persistance peut se faire sous deux formes : soit sous forme intégrée par liaisons covalentes au génome cellulaire **(provirus)**, soit sous forme de plasmide libre.

L'intégration peut assurer l'**expression permanente** de certaines parties des gènes viraux. La **transformation maligne**, chez l'animal, ou la **conversion lysogénique**, chez la bactérie, en sont des exemples particulièrement connus.

2.1.1.5. Infection persistante

Les tissus animaux sont fréquemment contaminés par des virus, comme le montrent les cultures cellulaires. Ils n'en sont pas pour autant altérés. Dans les infections chroniques, toutes les cellules infectées par un virus non cytocide reproduisent parfois le virus en grande quantité sans subir de dommage ; dans l'état de porteur, une faible proportion seulement des cellules est contaminée.

Copyrighted material

2.1.2. Interactions entre virus

On qualifie de **défectif** le virus qui a perdu l'une des fonctions nécessaires à sa réplication ou à sa persistance sous forme de provirus. Pour se perpétuer dans une cellule, le virus défectif utilise le matériel génétique d'un autre virus, appelé virus **assistant**.

L'infection simultanée d'une cellule par deux virus peut aboutir à plusieurs sortes d'interactions entre les deux génomes et la cellule considérée. Dans une telle situation, la multiplication d'un des virus peut être inhibée (**interférence**) ou stimulée (**facilitation**). Des échanges de matériel génétique peuvent donner naissance à des recombinants et à des mélanges phénotypiques.

Dans le cas des virus animaux, l'interférence est un état de résistance antivirale que confère à une cellule son infection préalable par un premier virus. Cette résistance peut être due à l'inhibition de l'adsorption du virus sur la membrane ou à un défaut d'expression génétique, ou encore à la production d'une protéine cellulaire (interféron). Plutôt rares chez les virus des animaux, les phénomènes de stimulation ou facilitation sont très fréquents chez les virus des plantes. Le principal rôle du virus facilitant serait, en toute hypothèse, d'inhiber la production d'interféron par la cellule en réponse à l'infection par le virus d'épreuve *(Paramyxoviridae)*.

2.2. Cycle de multiplication

Quels que soient les types de virus, leur cycle de multiplication dans la cellule permissive comprend plusieurs étapes communes :

– une **phase d'adsorption** par interaction d'un récepteur cellulaire (antigène HLA, antigène de groupe sanguin), de structure souvent mal connue, avec des protéines de surface des virions. Cette première étape est constante et obligatoire au cours de l'interaction virus-cellule *(fig. VIII.7)*. Elle est suivie de la pénétration, dans la cellule hôte, par endocytose (le virion se retrouve alors dans une vacuole intracellulaire) ou par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Le génome viral est ensuite libéré par décapsidation :

– une **phase d'éclipse** correspondant à la synthèse des constituants viraux couplée à ou suivie de la réplication de l'acide nucléique viral ;

– une **phase de maturation** correspondant à l'assemblage des unités de structure, à l'encapsidation de l'acide nucléique viral et à libération des virions reconstitués.

Si la première étape est sensiblement identique pour tous les virus et dans toutes les interactions virus-cellule, les deuxième et troisième phases diffèrent profondément selon qu'il s'agit de virus à ARN ou à ADN.

2.2.1. Virus à ARN

2.2.1.1. Le modèle poliovirus (virus à ARN$^+$)

L'adsorption résulte d'une complémentarité spécifique entre certains constituants de surface du virus et des sites membranaires de la cellule. Ces récepteurs cellulaires sont de nature glycoprotéique et n'existent que chez l'homme et certains singes. Le virion pénètre par pinocytose et subit un véritable déshabillage alors qu'il est encore attaché à la membrane de la cellule hôte. Il perd en particulier la protéine capsidale V_{P4}, par laquelle il s'adsorberait au récepteur cellulaire *(fig. VIII.8)*.

Cette décapsidation libère la molécule d'ARN sous une forme infectieuse, capable de se multiplier dans toutes les cellules dès lors qu'on l'y fait pénétrer. Cette phase dure environ 30 minutes.

Au cours de la phase d'éclipse, la cellule hôte ne contient pas de particules infectieuses. Elle est le siège, durant 2 à 3 heures, d'une abondante synthèse de constituants viraux, alors que ses propres synthèses sont stoppées. L'ARN du poliovirus qui est un ARN messager ou de type positif, aura successivement deux fonctions :

– comme messager, il s'associe aux ribosomes cellulaires et transcrit son information pour la synthèse de protéines virales : une réplicase ou ARN polymérase assurant la duplication de l'ARN viral ; une protéine inhibitrice bloquant la synthèse des ARN et des protéines de l'hôte ; enfin des protéines capsidales ;

– comme matrice (type positif) grâce à la réplicase formée dans un premier temps, il donne naissance à une chaîne complémentaire de type –. L'association des deux constitue la forme réplicative (FR). À partir du type négatif, des chaînes positives sont successivement copiées dont l'ensemble représente l'intermédiaire de réplication (IR). Seules les chaînes ARN de type positif, synthétisées en nombre beaucoup plus élevé que les chaînes de type négatif, sont infectieuses et utilisées pour la phase suivante.

Copyrighted material

A

Membrane plasmique endocytant le virus
Récepteur
Acide nucléique dans un nucléoïde
Enveloppe protéique ou lipidique

B

Attachement réversible
Attachement irréversible
Virus complet dans sa vésicule
Membrane cytoplasmique
Capside
Acide nucléique
Récepteur membranaire

C

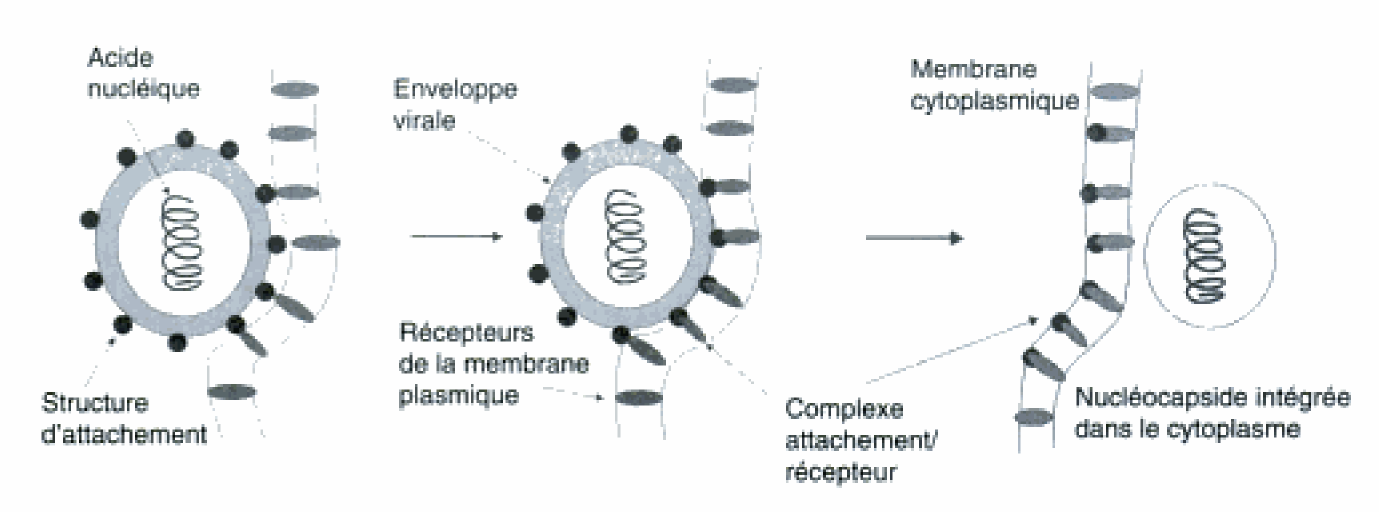


Figure VIII.7 – **Les différents modes de pénétration des virus animaux dans les cellules eucaryotes.**

A : virus non enveloppé, l'acide nucléique pénètre seul dans le cytoplasme ; B : virus enveloppé après attachement à des récepteurs membranaires, c'est l'ensemble de la nucléocapside qui rentre dans le cytoplasme ; C : virus complexe : le virus est endocyté (viropexie) après attachement à la membrane, la vésicule libère ensuite la nucléocapside dans le cytoplasme.

Copyrighted material

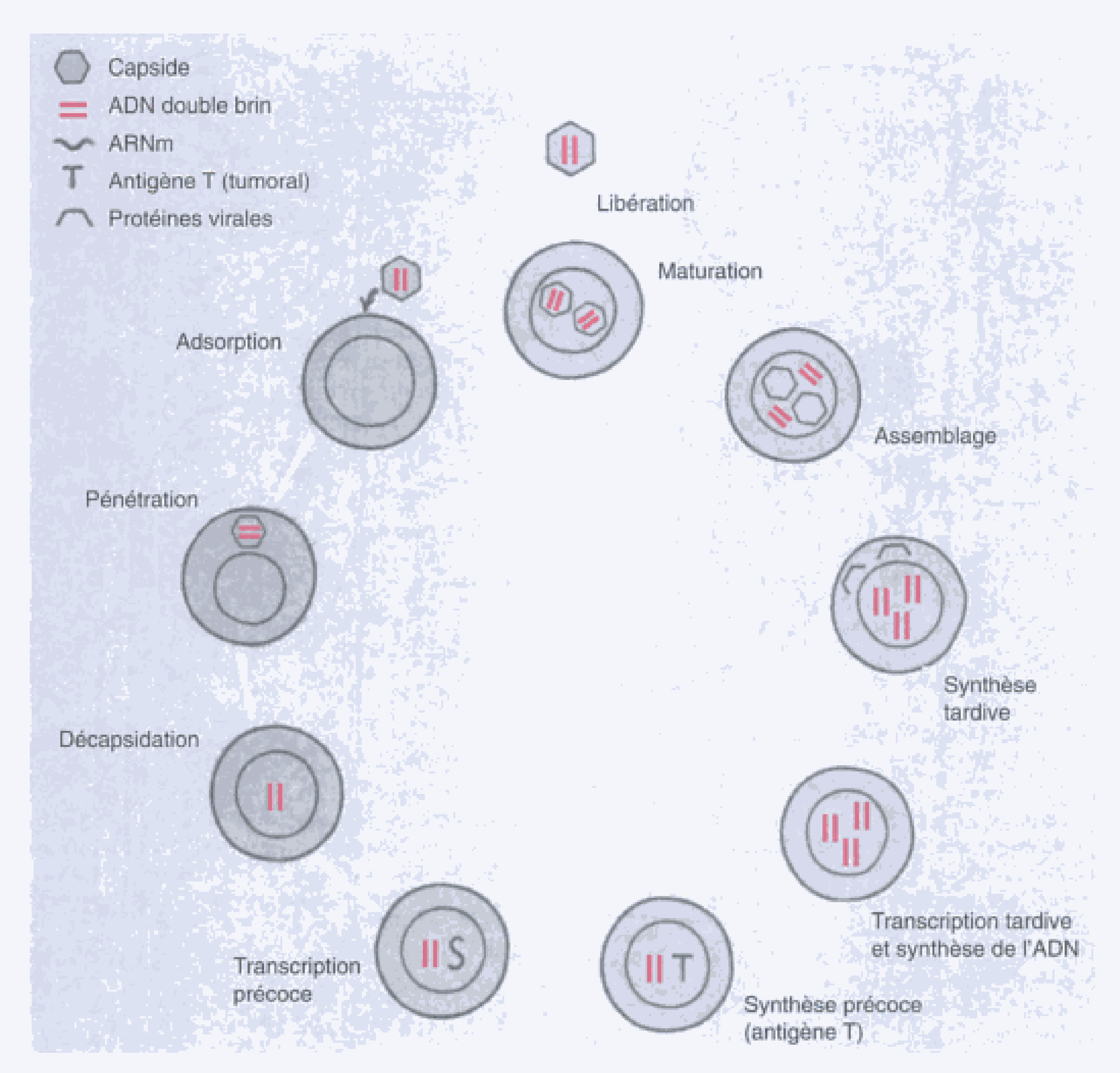


Figure VIII.10 – Différents stades de la réplication d'un adénovirus.

ADN de la chaîne d'ARN pour former un hybride ADN-ARN qui est alors utilisé par la même enzyme pour fabriquer une double hélice d'ADN ; cette copie ADN de l'ARN génomique s'intègre alors dans un chromosome de la cellule hôte. L'intégration est facilitée par une enzyme de recombinaison spécifique codée par le virus, qui reconnaît une séquence d'ADN viral particulière et catalyse l'insertion de l'ADN viral dans pratiquement tous les sites d'un chromosome de la cellule hôte. Puis vient la transcription de l'ADN viral intégré par l'ARN polymérase de la cellule hôte, engendrant un grand nombre de molécules d'ARN viral identiques au génome infectieux d'origine. Enfin, ces molécules d'ARN sont traduites afin de produire les protéines de la capside et de l'enveloppe ainsi que la transcriptase inverse qui sont assemblées avec une molécule d'ARN dans de nouvelles particules virales enveloppées qui bourgeonnent à la surface de la membrane plasmique.

2.2.4. Transformation tumorale

De nombreux virus peuvent passer à l'état de provirus dans les cellules qu'ils infectent. Ils se transmettent verticalement de cellule mère à cellules filles. Des gènes du provirus con-

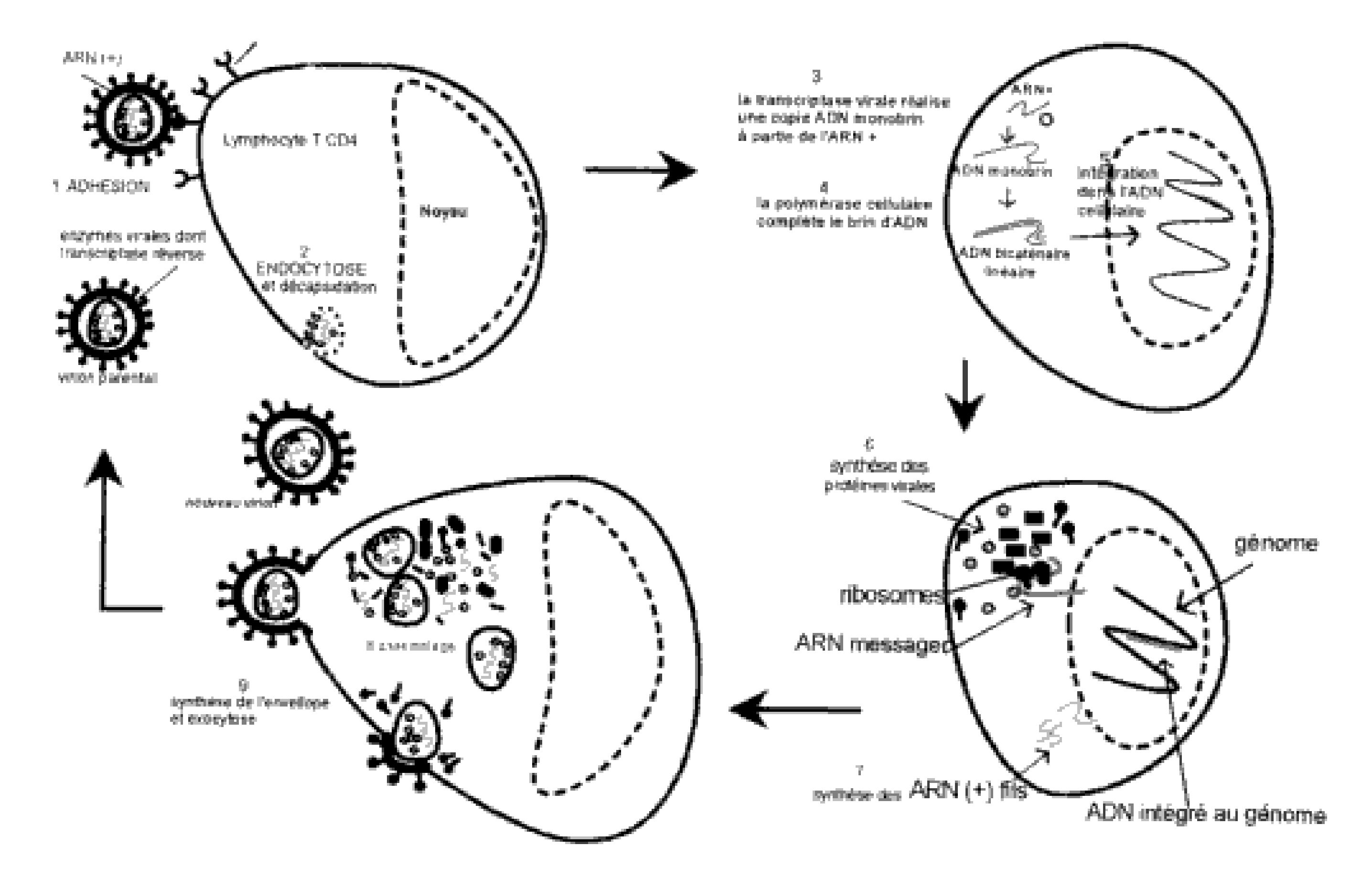


Figure VIII.11 – Cycle de réplication d'un rétrovirus.

tinuent de s'exprimer et leur activité confère alors à la cellule des propriétés structurales, antigéniques et physiologiques nouvelles : c'est la **transformation**. La transposition *in vivo* de ces cellules transformées produit fréquemment le développement d'une tumeur (oncogenèse virale).

Près d'un quart des virus répertoriés chez les animaux ont un potentiel oncogène, qu'ils soient à ARN ou à ADN. En règle générale, les virus à ARN transformant continuent à se multiplier dans la cellule transformée, alors que ceux à ADN en sont incapables.

Pour les virus oncogènes à ARN, l'infection d'une cellule permissive induit souvent simultanément une libération de virus par bourgeonnement à la surface cellulaire et une modification génétique définitive qui rend la cellule infectée cancéreuse en provoquant la synthèse de nouvelles protéines qui modifient le contrôle de la prolifération de la cellule hôte. Les gènes qui codent pour de telles protéines sont appelés oncogènes.

Les cellules transformées peuvent se multiplier en milieu gélosé et en présence d'un faible pourcentage de sérum ; elles perdent simultanément leur pouvoir de régulation de la croissance (inhibition de contact). Toutefois, pour la plupart d'entre elles, ces nouvelles propriétés disparaissent rapidement : on dit que la transformation est abortive. Pour les autres, cette transformation reste stable. Elle entraîne alors une modification morphologique (arrondissement des cellules), physiologique (croissance en milieu solide, perte de la dépendance d'ancrage), antigénique (expression d'antigènes fœtaux, modification d'antigènes de surface), biochimique (disparition de structure de surface, agglutinabilité par des lectines, disparition de la fibronectine) : la cellule est immortalisée et, introduite chez l'animal, elle provoque le développement d'une tumeur.

2.3. Virus et bactéries : les bactériophages

2.3.1. Phénomène de bactériophagie

L'existence de ce phénomène a été révélée en 1915 par Twort qui décrivit la transformation vitreuse de certaines colonies de microcoques. La maladie pouvait être transmise par simple contact de colonie à colonie. Presque simultanément, en 1917, d'Herelle, à l'Institut Pasteur de Paris, découvre dans les selles de convalescents de dysenterie un agent infectieux de même type, capable de détruire spécifiquement des cultures de *Sh. dysenteriae*. L'agent responsable de cette lyse transmissible est appelé **bactériophage**. Les bactériophages sont les virus des bactéries.

Copyrighted material

2.3.1.1. En milieu liquide

À une culture en milieu liquide de bactéries, par exemple d'*E. coli* en phase de croissance, ajoutons une suspension de bactériophages actifs sur *E. coli*. Un certain nombre de cellules sont infectées par le phage et sont lysées en l'espace de 20 à 30 minutes en moyenne. Les phages qui sont libérés à la suite de ce premier cycle de multiplication sont capables d'infecter d'autres cellules et de les détruire à leur tour. Ainsi, en l'espace de quelques heures, la totalité ou la majorité des bactéries sont lysées et l'on note un net éclaircissement de la culture par rapport à un témoin non infecté. Cet éclaircissement est la manifestation visible du phénomène de lyse.

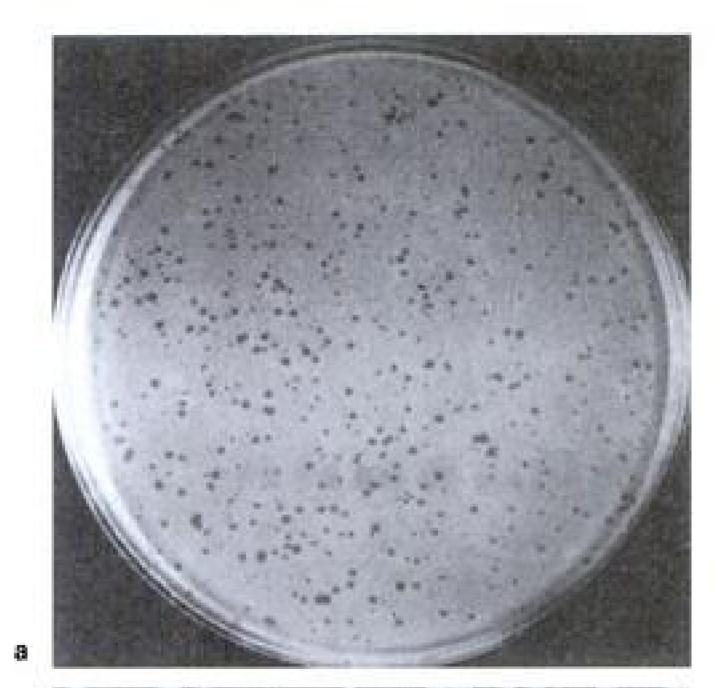
2.3.1.2. Sur milieu solide

Sur un milieu gélosé *(fig. VIII.12)*, on étale avec soin la même culture jeune d'*E. coli* de façon à obtenir une nappe homogène. À un endroit précis, par exemple au centre, on dépose une goutte d'une suspension de bactériophages actifs puis on incube à la température optimale de multiplication de la bactérie, soit 37 °C. Au bout de 5 à 6 heures, on observe une culture confluente sur le milieu et, au centre, une zone circulaire appelée **plage de lyse**, vierge de germes, aux contours nets, distincte du film bactérien qui l'encercle ; elle résulte de la multiplication des bactériophages et de la destruction totale des cellules microbiennes *in situ*.

2.3.1.3. Isolement et dénombrement

Cette zone de lyse totale est déterminée par un très grand nombre de corpuscules bactériophagiques présents initialement. Il est très facile de connaître ce nombre. Pour cela, on étale à la surface d'une plaque de gélose, ensemencée comme précédemment, une dilution convenable de la suspension bactériophagique. Après incubation, on observe à la surface du milieu un tapis trouble parsemé de zones claires ou plages *(fig. VIII.12)* Chaque plage correspond à un corpuscule bactériophagique qui, en infectant les bactéries et en se multipliant à leurs dépens, détruit localement le film superficiel. En somme, une plage provient d'un seul corpuscule phagique de la même façon qu'une colonie bactérienne est produite par une bactérie. Il est ainsi possible d'isoler les bactériophages et de les dénombrer, donc d'étudier leur multiplication.

a



b

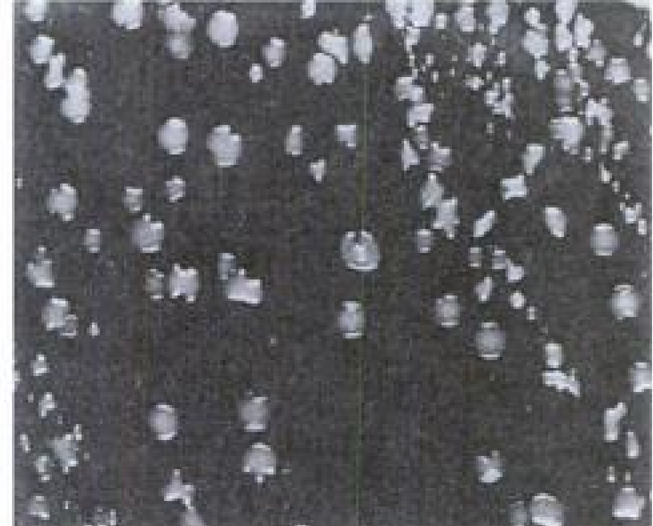


Figure VIII.12 – **Phénomène de bactériophagie sur milieux solides.**

a : plages sur une nappe bactérienne d'*E. coli* ;

b : colonies bactériennes de *S. paratyphi* B, « parasitées » par un bactériophage.

2.3.2. Structure des bactériophages

Les phages présentent une architecture analogue aux virus : ils sont constitués d'unités de structure protéiques entourant et protégeant un acide nucléique ; l'ensemble constitue la capside. Le phage possède toutes les propriétés des virus, en particulier le pouvoir infectieux. On distingue des phages à ADN et des phages à ARN. On en dénombre actuellement plusieurs milliers.

2.3.2.1. Bactériophages à ADN

Les plus connus sont les phages de la série T, actifs sur *E. coli*. Ils comprennent 7 types différents (de T_1 à T_7) que l'on classe en deux groupes : les T pairs (T_2, T_4, T_6), dont l'ADN contient de l'hydrométhylcytosine au lieu de la cytosine, et les T impairs (T_1, T_3, T_5, T_7). La structure de l'ADN est celle d'une double hélice ouverte.

Le phage λ (*E. coli* K_{12}) contient aussi une double hélice d'ADN stabilisée par les appariements classiques A-T, C-G entre les deux chaînes. Cette double hélice est également ouverte et

Copyrighted mater

2.3.3. Infection lytique et bactériophages virulents – Cycle de multiplication

L'infection de la bactérie hôte par un bactériophage présente deux aspects *(fig. VIII.14)* :

– le bactériophage se reproduit aux dépens de la bactérie et la détruit, c'est l'**infection lytique**. Les bactériophages qui lysent ainsi toutes les bactéries qu'ils infectent sont appelés des **bactériophages virulents** ;

– l'acide nucléique injecté par le phage, au lieu de se répliquer d'une façon autonome comme précédemment, s'intègre au chromosome bactérien. Il se comporte comme un gène bactérien et se réplique en parfaite harmonie avec le chromosome. Pour bien marquer ces caractères, on lui donne le nom de prophage. Ce type de relation entre la cellule hôte et le virus est connu sous le nom de **lysogénie**. Les bactéries qui portent un prophage et le perpétuent dans leur descendance sont des **bactéries lysogènes**. Le phage est appelé un **bactériophage tempéré**.

2.3.3.1. *Phase d'adsorption et de pénétration (fig. VIII.15)*

• **Conditions**. L'adsorption dépend en premier lieu de la concentration relative des bactéries et des phages : plus elle est élevée, plus les chances de rencontre sont grandes. Pour que les collisions

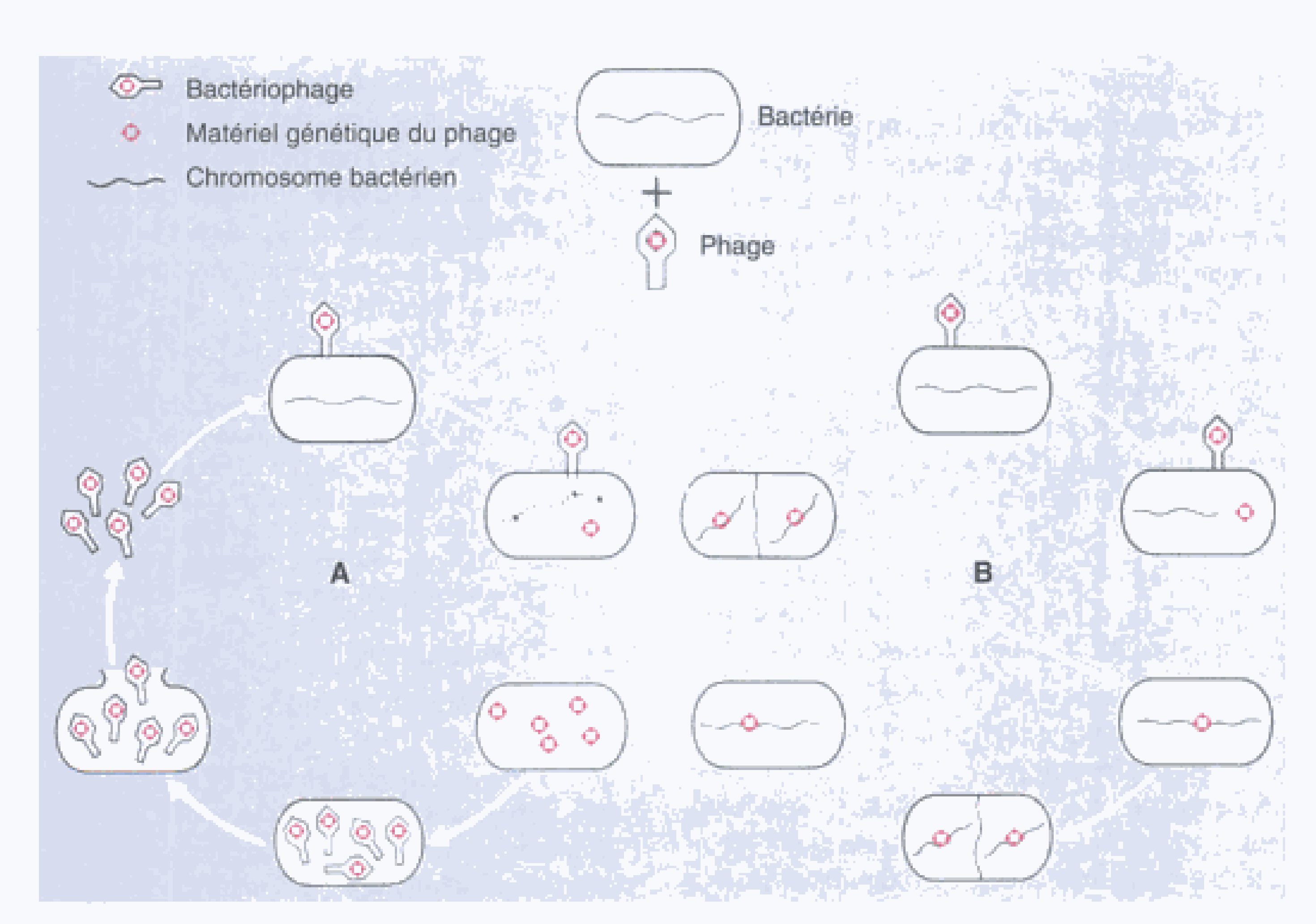


Figure VIII.14 – **Infection des bactéries par le bactériophage.**

A. Infection lytique : le bactériophage injecte son acide nucléique qui se reproduit de façon autonome. Cette multiplication conduit à la lyse de la cellule et à la libération de nouvelles particules phagiques.
B. Lysogénie : l'acide nucléique du phage s'incorpore au chromosome (prophage) et se divise en même temps que lui. La bactérie survit à l'infection.

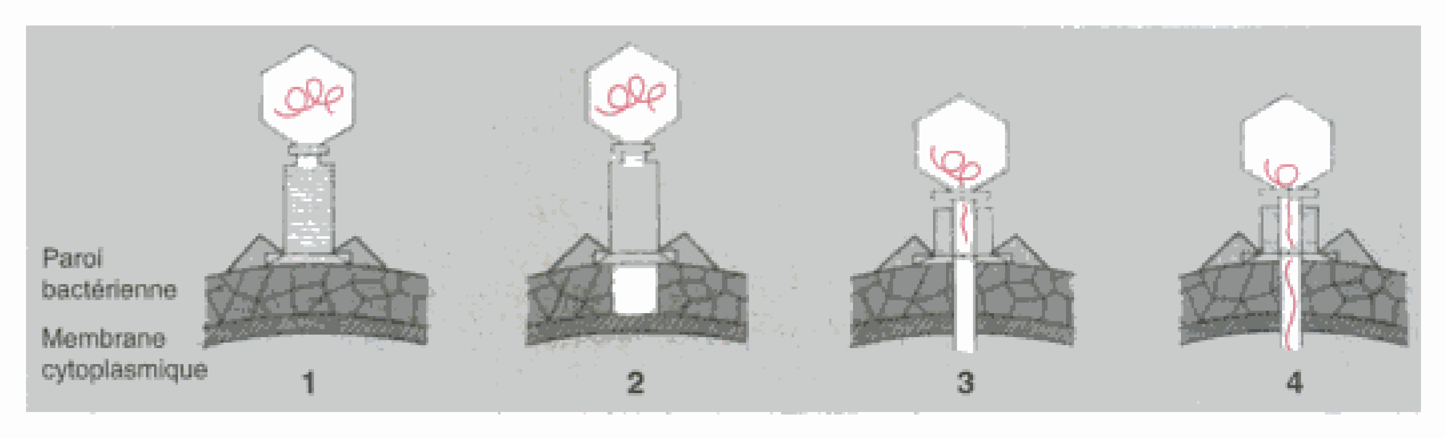


Figure VIII.15 – Injection de l'ADN viral par le bactériophage T_2.

1. adsorption du phage sur la paroi de la bactérie ; 2. destruction des constituants de la paroi par l'enzyme du phage ; 3. contraction de la gaine externe et pénétration du tube interne ; 4. injection de l'ADN dans le cytoplasme de la bactérie.

soient efficaces, le milieu doit contenir des cofacteurs d'adsorption dont la nature varie selon les bactériophages. Ce sont des cations tels que le calcium, le magnésium, et des acides aminés comme le tryptophane, etc.

• **Récepteur bactérien.** Les conditions les plus favorables étant réunies, l'adsorption résulte alors de l'existence de structures complémentaires présentes sur la bactérie et le phage. En effet, un bactériophage ne se fixe pas sur n'importe quelle bactérie. Cette spécificité, plus ou moins étroite, se situe, chez la bactérie, au niveau de la paroi. Les phages sont incapables de se fixer sur les sphéroplastes chez lesquels les structures de paroi ont presque totalement disparu. Les récepteurs phagiques sont situés sur la couche lipoprotéique de la paroi d'*E. coli* pour les phages T_2 et T_6. Ils sont localisés dans la couche lipopolyhosidique pour les phages T_3, T_4 et T_7. Une seule bactérie peut fixer ainsi de 200 à 300 bactériophages.

• **Fixation**. Elle s'effectue par l'intermédiaire des fibres caudales et de la plaque terminale. On peut s'en rendre compte en mettant en présence des débris de phage et des bactéries : seules les queues ou les fibres caudales se fixent ; les têtes ou l'ADN en sont incapables. La fixation, réversible à son début, devient rapidement irréversible par suite de la modification des structures bactériennes et phagiques en contact.

Une enzyme (lysozyme) située dans la queue du phage entre ensuite en action : elle dépolymérise le mucocomplexe de la paroi bactérienne en coupant les liaisons glycosidiques. Les destructions locales diminuent la rigidité et la résistance de la paroi.

• **Injection de l'ADN**. La contraction de la gaine externe est alors déclenchée, sans doute sous l'effet des produits libérés par l'hydrolyse du mucopolysaccharide de la paroi. Le tube interne de la queue traverse la zone de moindre résistance, perce la membrane, livrant ainsi passage au filament d'ADN. Celui-ci pénètre dans le cytoplasme tandis que les enveloppes phagiques vides (fantômes) restent à l'extérieur.

Une expérience simple (Hershey et Chase, 1952) a permis de mettre en évidence ce mécanisme. Les constituants d'une suspension de phages sont marqués à l'aide d'éléments radioactifs : l'ADN par du ^{32}P et les protéines par du ^{34}S. Les phages sont mis ensuite au contact de bactéries sensibles qu'ils infectent. Si l'on sépare brusquement les phages et les bactéries, on constate que toute la radioactivité de l'ADN viral est contenue dans les bactéries, tandis que celles des protéines marquées restent à l'extérieur.

2.3.3.2. *Phase d'éclipse*

Le virion, après avoir injecté son ADN, cesse d'exister en tant que particule infectieuse indépendante. D'importants événements se succèdent au cours d'une phase dite d'**éclipse** d'une durée de 12 minutes. Cette étape est caractérisée par de nombreuses synthèses de nature phagique *(fig. VIII.16)* mais également par l'absence de virions. La cellule bactérienne, ouverte à l'aide de lysozyme par exemple, ne libère aucune particule infectieuse.

• **Destruction du chromosome bactérien**. Dès l'infection, la croissance bactérienne est stoppée ainsi que la synthèse de l'ADN bactérien. Le chro-

Copyrighted material

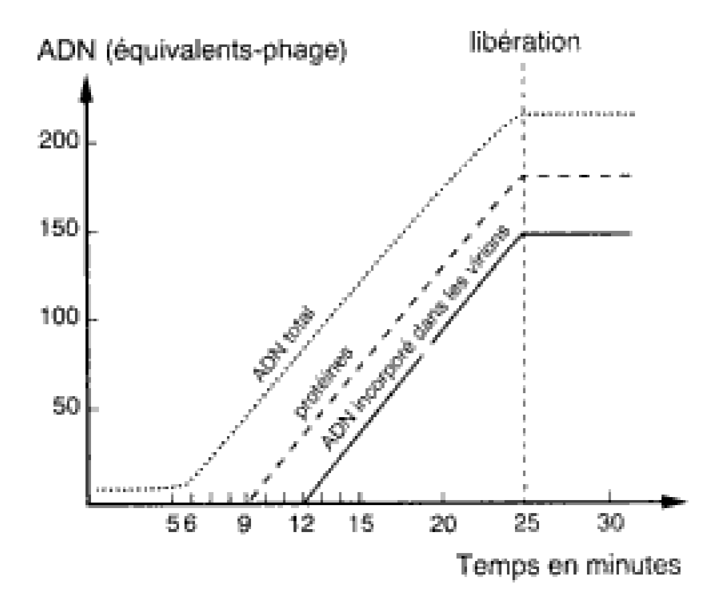


Figure VIII.16 – **Synthèse des constituants viraux au cours de la phase d'éclipse.**
- 6ᵉ minute : apparition de l'ADN phagique ;
- 9ᵉ minute : apparition des protéines phagiques ;
- 12ᵉ minute : apparition des premiers virions ;
- 25ᵉ minute : libération des virions (environ 150).

mosome bactérien est détruit par une désoxyribonucléase qui apparaît 2 à 3 minutes après l'infection. De ce fait, l'information génétique de la bactérie portée par cet ADN disparaît : c'est l'arrêt total de toutes les synthèses bactériennes. Les autres structures cellulaires restent pourtant intactes et fonctionnelles ; elles vont servir aux synthèses bactériophagiques.

• **Synthèse de constituants précoces**. Le premier élément synthétisé est un ARN messager de type phagique. Il est facile de s'en rendre compte car il contient de l'hydroxyméthylcytosine (HMC) au lieu de la cytosine. En même temps, les protéines nouvelles ou précoces apparaissent (au moins 14). Ce sont des enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN viral : polymérases, kinases, etc. Leur synthèse se poursuit durant environ 15 minutes.

• **Synthèse de l'ADN**. L'ADN viral est mis en évidence dans la bactérie 6 minutes environ après le début de l'infection. Connaissant la quantité d'HMC contenue dans un virion et celle contenue dans une bactérie infectée, on peut déduire le nombre d'équivalents-phages que renferme une cellule en établissant le rapport de ces deux quantités. Ce nombre croît linéairement jusqu'à la 25ᵉ minute, moment de la libération des nouveaux virions. La synthèse de leur ADN est dirigée par l'ADN phagique injecté au cours de la première phase. Elle s'effectue aux dépens des débris de l'ADN bactérien et également grâce aux métabolites présents dans le milieu.

• **Synthèse des protéines**. Les protéines de structure (tête et queue) apparaissent 9 minutes environ après l'infection. La quantité de protéines, calculée comme précédemment en équivalents-phages, croît parallèlement à celle de l'ADN. La synthèse de ces protéines est dirigée par l'ADN phagique et les ARN messagers correspondants. Elle fait appel aux acides aminés présents dans la bactérie et le milieu de culture. Elle s'effectue au niveau des ribosomes de la bactérie. Ainsi, la bactérie continue son travail de synthèse et de dégradation mais c'est l'ADN phagique, et non l'ADN bactérien, qui préside aux nouvelles destinées de la cellule infectée. Une nouvelle information génétique, celle du bactériophage, règle l'activité cellulaire : toutes les substances élaborées sont, dès lors, de nature phagique. Les constituants spécifiques du phage, une fois synthétisés, s'accumulent séparément sans reconstituer de nouvelles particules infectieuses.

2.3.3.3. Phase de maturation et de libération

• **Maturation**. Ce n'est que vers la 12ᵉ minute qu'apparaissent les premiers virions. Leur nombre augmente ensuite linéairement jusqu'à la phase de libération *(fig. VIII.16)*. À la douzième minute, une certaine quantité d'ADN est déjà synthétisée qui correspond à 50 ou 60 équivalents-phages. Elle s'est accumulée et forme ce qu'il est convenu d'appeler un fonds commun. À partir de la 12ᵉ minute, pour chaque molécule d'ADN synthétisée et apportée dans le fonds commun, une molécule d'ADN de ce fonds commun est incorporée pour la maturation d'un virion. Le plafond de 50 à 60 équivalents-phages reste donc constant et les deux courbes d'évolution de l'ADN total et de l'ADN incorporé dans les virions suivent un tracé rigoureusement parallèle.

Le mécanisme de cette maturation est peu connu dans son détail. L'ADN se condense puis s'entoure d'unités protéiques reconstituant la tête du phage. Les éléments de la queue s'associent ensuite. De nouveaux virions sont ainsi formés. Il

Copyrighted material

phage, enfin et surtout à l'avènement des sulfamides et des antibiotiques beaucoup plus actifs dans le traitement des maladies infectieuses.

2.3.5.2. Diagnostic

Le diagnostic direct d'une maladie infectieuse, chez l'homme, ou la mise en évidence d'une bactérie dans une substance alimentaire mettent en œuvre des techniques d'isolement puis d'identification du germe responsable, techniques qui font appel à des critères d'ordre morphologique, biochimique et sérologique. Il est également possible de démontrer la présence d'un micro-organisme dans un milieu en ayant recours aux bactériophages.

2.3.5.2.1. Recherche directe

Les bactériophages accompagnent toujours les bactéries dans les milieux où elles végètent. Ils peuvent être mis en évidence directement et témoigner alors de la présence des bactéries correspondantes. C'est ainsi que des bactériophages spécifiques de l'antigène Vi (récepteur phagique) isolés d'une eau, montrent que cette eau a été ou est probablement contaminée par *S. typhi* pourvu de cet antigène. La présence des bactériophages actifs sur le groupe des *Enterobacteriaceae* et en particulier sur *E. coli* (phages polyvalents) prouvera que l'échantillon soumis à l'analyse contient des colibacilles, indice d'une pollution organique.

2.3.5.2.2. Recherche indirecte

Une seconde méthode de diagnostic fait aussi appel aux bactériophages. Elle repose sur l'augmentation du titre des bactériophages spécifiques introduits expérimentalement dans un milieu, lorsqu'il contient les bactéries correspondantes. Ainsi, dans une eau susceptible de renfermer *S. typhi*, on peut ajouter des bactériophages spécifiques de l'espèce à un titre donné et rechercher ensuite si ce titre reste égal à lui-même ou, au contraire, augmente. L'accroissement se produit uniquement dans le cas où l'échantillon est contaminé par le bacille typhique. Ce principe peut être appliqué à la recherche des entérobactéries pathogènes dans toute substance organique contaminée : selles, urines, sang, lait, conserves, etc. C'est la réaction d'augmentation du titre bactériophagique.

Les méthodes de diagnostic faisant appel aux bactériophages ont trois qualités principales : elles sont simples, rapides et économiques. Elles se prêtent particulièrement à la réalisation de vastes enquêtes épidémiologiques dans une contrée ou un pays donné. Malheureusement, leur spécificité n'est pas toujours rigoureuse et, en raison de ce fait, il ne semble pas qu'elles puissent jamais remplacer les techniques bactériologiques usuelles.

2.3.5.2.3. Identification

Un bactériophage, lorsqu'il est spécifique d'une espèce bactérienne, peut être utilisé à des fins d'identification. Cela permet de différencier des espèces très proches par leurs caractères physiologiques. Il existe, par exemple, des bactériophages spécifiques de *Y. pestis* capables de lyser toutes les souches de cette espèce quelle que soit leur provenance et qui sont inactifs sur les autres *Yersinia*. De même, le diagnostic différentiel entre *V. comma* et *V. comma* El Tor repose, en partie, sur l'utilisation de préparations phagiques : le choléra-phage IV de Mukerjee est actif sur la première espèce et non sur la seconde ; les choléra-phages 1 et 2 de Nicolle et Gallut ont une action inverse.

2.3.5.3. Études épidémiologiques : lysotypie

La taxonomie classe les bactéries, on l'a vu, en familles, en tribus puis en genres et en espèces. Les souches qui composent l'espèce sont rarement homogènes, tant du point de vue physiologique qu'antigénique (voir chap. II).

Lorsqu'il s'agit d'espèces pathogènes responsables d'épidémies, comme *S. typhi* et *E. coli*, de gastro-entérites infantiles ou encore du vibrion cholérique, l'étude de la filiation des cas exige souvent des renseignements très précis sur les germes. Les caractères biochimiques et antigéniques sont ici insuffisants. D'autres procédés permettent « d'affiner » l'identification dans un but épidémiologique beaucoup plus qu'à des fins systématiques. Ce sont, par exemple, la lysotypie, la recherche de la production de bactériocines, celle des facteurs de résistance aux antibiotiques (RF). La première de ces méthodes, la lysotypie, qui met en œuvre l'action des bactériophages sur les bactéries, sera rapidement décrite.

Lorsque l'on met en contact un bactériophage donné et plusieurs souches d'une même espèce, les unes, très sensibles, sont totalement lysées, d'autres le sont partiellement, d'autres enfin sont résistantes. Grâce à un seul bactériophage, on peut donc définir trois catégories de souches dans l'espèce. En utilisant plusieurs phages, le nombre de catégories s'élève davantage. Chaque catégorie ainsi créée est un lysotype ; elle comprend toutes les cultures donnant la même réaction vis-à-vis des préparations phagiques utilisées.

La valeur de cette nouvelle classification dépend, d'une part, de la qualité des préparations phagiques sélectionnées et de leur bonne conservation, d'autre part, de la stabilité des lysotypes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui est généralement constaté. Aussi, la lysotypie est-elle réservée à des centres spécialisés pourvus d'un personnel entraîné et disposant d'une collection de bactériophages constamment entretenue et vérifiée. Il en existe, en principe, un par pays : en France, c'est le Service des bactériophages de l'Institut Pasteur de Paris qui est reconnu comme centre national de lysotypie.

Les méthodes de lysotypie sont indispensables en épidémiologie : elles fournissent en effet des renseignements du plus haut intérêt. Sur le plan régional, elles permettent, au cours d'une enquête, d'établir les relations de cause à effet, c'est-à-dire la filiation des cas : l'origine d'une fièvre typhoïde survenant dans une contrée sera la même pour tous les malades si l'on isole chez eux le même lysotype de *S. typhi* ; sinon elle sera différente. Une enquête épidémiologique sérieuse et complète exige donc la recherche des types bactériophagiques chez tous les individus contaminés.

Sur le plan mondial, la lysotypie sera une source d'informations intéressantes, permettant de connaître la distribution des lysotypes dans chaque pays et chaque continent, de même que leur évolution dans le temps.

Copyrighted mater

3. Interactions virus-organisme

3.1. Transmission des virus

Il faut distinguer la transmission des virus par contact, ou transmission horizontale, et la transmission héréditaire, ou transmission verticale :

– dans la **transmission verticale**, l'infection de la lignée germinale de l'hôte perpétue les gènes viraux dans la descendance. Cette situation s'observe avec les rétrovirus ;

– la **transmission horizontale** se fait, le plus communément, par contact direct digestif (eau ou aliments contaminés) ou aérien (aérosols de gouttelettes de sécrétion). On connaît toutefois deux cas particuliers de transmission horizontale :

- la **transmission transplacentaire**, de la mère au fœtus, qui peut être responsable d'embryopathies ou de fœtopathies entraînant de graves anomalies congénitales ou la mort fœtale alors que l'affection est bénigne chez mère (virus de la rubéole, virus des inclusions cytomégaliques, herpès virus).

- la **transmission par vecteurs**, le plus souvent moustiques ou tiques, concernant notamment les arbovirus responsables d'affections comme la fièvre jaune, la dengue ou les encéphalites estivales.

3.2. Pathogénie

Les différentes interactions virus-cellules conduisent à la mort cellulaire ou à sa transformation ou encore à la production continue de virus. Elles engendrent dans l'organisme animal trois manifestations pathologiques : les maladies virales **aiguës**, les maladies virales **persistantes**, les **tumeurs** et les **leucémies**.

3.2.1. Maladies virales aiguës

De nombreux virus déterminent chez l'homme des maladies aiguës (grippe, poliomyélite, rougeole, oreillons, fièvre jaune, etc.).

Le virus pénètre dans l'organisme et se multiplie d'abord localement (dans la muqueuse respiratoire par exemple), puis dans les ganglions lymphatiques afférents. De là, il passe dans le sang : c'est la **première virémie**. À l'état libre ou associé à des éléments figurés (lymphocytes), il gagne le système réticulo-endothélial où il se multiplie, puis passe à nouveau dans le sang, réalisant une **deuxième phase de virémie**. Le virus atteint alors les tissus ou organes cibles (par exemple, le tissu nerveux pour le virus de la poliomyélite) comme on peut le voir sur la *figure VIII.18*.

La propagation du virus s'effectue en trois stades successifs. À partir de la porte l'entrée, il diffuse (trajet) jusqu'à l'organe cible, ce qui permet de prévoir, en fonction de la distance qui sépare les deux, la durée de la période d'incubation de la maladie : brève (quelques jours) si les deux sont confondus (grippe, rhume), longue (de 10 à 20 jours) si les deux sont éloignés (oreillons, rougeole, poliomyélite). En règle générale, les voies de cheminement des virus sont le sang ou la lymphe, exception faite du virus de la rage qui se propage le long des filets nerveux. Les périodes d'invasion et d'état correspondent respectivement à la lyse cellulaire qui libère des substances toxiques, ou pyrogènes, et aux réactions immunitaires de l'hôte. Les réactions antigène-anticorps acti-

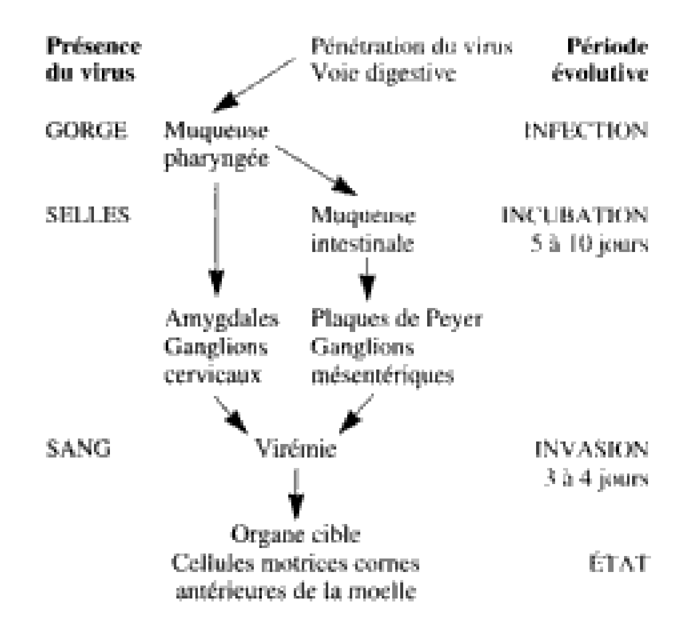


Figure VIII.18 – **Pathogénie de la poliomyélite.**

Copyrighted material

cié DT-polio) et de procéder aux rappels au bout de 1 an, puis tous les 5 ans, au moyen du vaccin vivant.

Les rotavirus transmis par la voie oro-fécale touchent les nourrissons en période hivernale sous la forme d'une gastro-entérite aiguë (diarrhée aqueuse par fuite d'eau et vomissement). La guérison se produit généralement au bout de 4 à 7 jours. Dans les services de pédiatrie, les rotavirus sont souvent à l'origine d'infections nocosomiales. Les adultes sont rarement touchés par ce virus.

L'hépatite épidémique est aussi transmise par voie digestive : eau, coquillages contaminés, etc.

3.3.3. Transmission par contact

Les virus de l'herpès sont très fragiles, leur transmission se fait par contact direct (salive, lésions cutanées, rapport sexuel, accouchement, transfusion).

Les *Herpes simplex virus* sont très fréquents chez l'homme. L'herpès oral (sous forme de vésicules aux bords des lèvres) et l'herpès génital (avec des vésicules au niveau du pénis ou du vagin) sont les formes les plus courantes et relativement bénignes. Des formes plus graves (kératite pouvant aboutir à la cécité, atteinte du système nerveux central dans les formes néonatales) existent.

3.3.4. Transmission par morsure et piqûre

La rage est une encéphalite aiguë à évolution constamment mortelle. Elle débute par des symptômes généraux : fièvre, nausées, vomissements, maux de tête. Le malade est anxieux : le moindre souffle d'air ou la simple vue de l'eau le rend nerveux (aérophobie, hydrophobie) et provoque des crises convulsives. La déglutition engendre des spasmes musculaires douloureux. À ce stade, la maladie évolue en quelques jours vers la mort.

L'homme n'est qu'un hôte accidentel. De nombreux animaux sauvages ou domestiques sont des réservoirs du virus : chien, loup, renard, chacal, chauve-souris vampire ou insectivore. La plupart des cas humains sont causés par des morsures de chiens infectés. La maladie est localisée dans certaines contrées d'Asie, d'Afrique ou d'Amérique. Elle s'étend actuellement dans les régions de l'est et du nord-est de la France par suite de l'extension de la rage vulpine. Le premier vaccin fut préparé par Pasteur à l'aide d'une souche de virus fixé, c'est-à-dire de virulence atténuée, maintenue par passage sur cerveau de lapin. Ce vaccin vivant a été remplacé depuis quelques années par un vaccin inactivé par le phénol. On tend à lui substituer actuellement des vaccins préparés à partir de cerveaux de souriceaux nouveau-nés (moins allergisants) ou, mieux encore, à partir de cellules diploïdes humaines, qui sont ensuite inactivés.

La fièvre jaune et les encéphalites animales sont transmises par des arthropodes vecteurs.

3.3.5. Transmission par voie sexuelle ou sanguine

La maladie baptisée syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) représente la première grande pandémie de la seconde moitié du XXe siècle. Elle prend à l'heure actuelle une importance considérable tant sociale que médicale. Décrite pour la première fois en 1981, elle a pour cause un virus, probablement apparu en Afrique centrale vers 1950 chez les singes verts, qui aurait été transmis à l'homme puis serait devenu pathogène par mutation. Il s'est ensuite propagé aux Caraïbes puis aux États-Unis avant de parvenir en Europe et de se répandre dans tous les continents. Ce virus, le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), est un rétrovirus (genre Lentivirus) qui, pour se multiplier, transforme l'ARN dont il est constitué en ADN qui s'intègre au chromosome de la cellule infectée, le cycle de développement étant très complexe (voir § 2.2.3.).

Il se transmet par voie sexuelle (sperme et sécrétions génitales) et sanguine (transfusion, échange de seringues) ou encore materno-fœtale.

Ce sont essentiellement les lymphocytes T CD_4 qui en sont la cible. Ces cellules étant le lieu de la réponse et de la régulation immunitaire, le malade se trouve alors, du fait de leur destruction lente mais inéluctable, en état de complète déficience et offre un terrain propice à toutes les infections

Copyrighted mater

2.1. Quelle est cette action ? Comment appelle-t-on cet autre type de phage ?

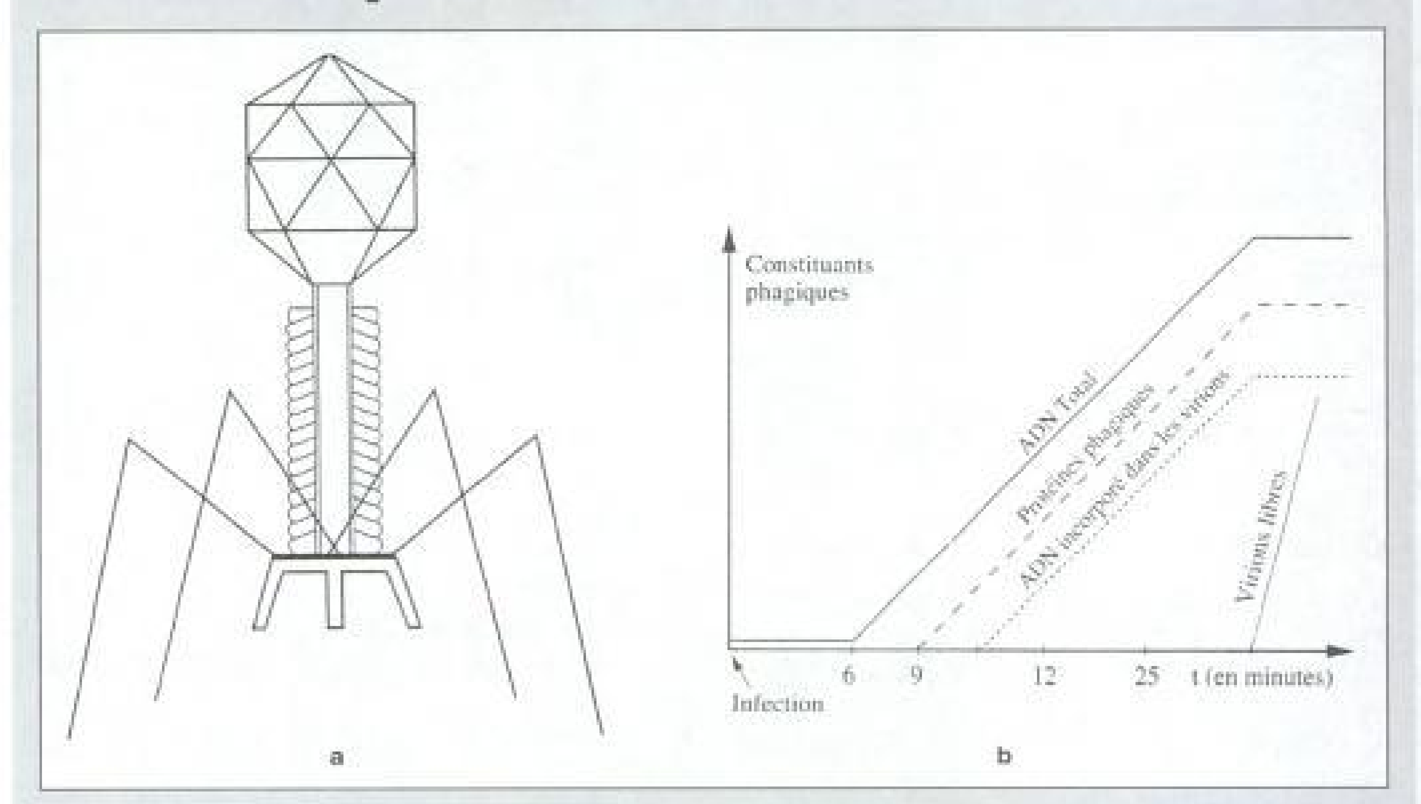
2.2. Représenter sur un même graphe la croissance de la bactérie sans phage et celle en présence de ce type de phage lorsque l'infection débute en début de phase exponentielle.

5. Le bactériophage T_2

E. coli est une bactérie sensible au bactériophage T_2 dont la structure est représentée sur la figure a.

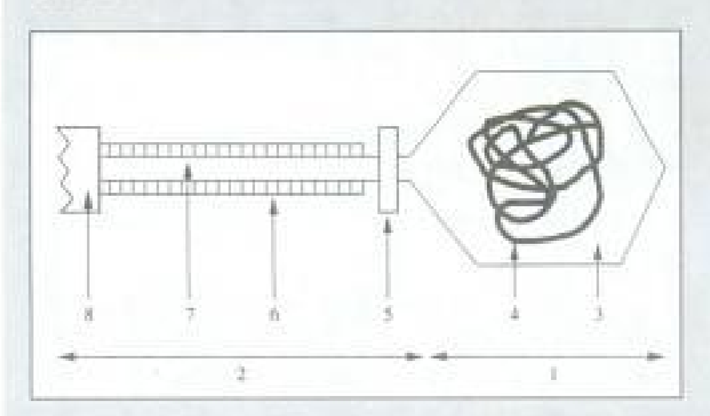
1. Légender ce schéma.

2. Les courbes de la figure b. représentent les différents effets de l'infection d'*E. coli* par le bactériophage T_2. Schématiser les différentes étapes de cette infection.



6. Bactériophages de lactobacilles

À partir de lactosérum de fromage, on a isolé des bactériophages de lactobacilles. Le virus actif a une longueur totale de 212 nm et sa structure est représentée sur la figure ci-dessous.



1. Compléter ce schéma.

2. Le cycle de multiplication de ce virus dans les lactobacilles est similaire au cycle lytique du bactériophage T_2 chez *E. coli*. Décrire ce cycle.

3. L'échantillon de lactosérum a été filtré sur membrane pour éliminer les bactéries. Dans deux boîtes contenant un milieu de culture gélosé, on dépose au centre 1 goutte de culture de 24 heures de la souche sensible au phage et 1 goutte de la dilution de filtrat de lactosérum avec des pipettes calibrées délivrant 25 gouttes par millilitre. On étale avec un étaleur stérile. On incube pendant 6 heures à 30 °C puis on dénombre les plages de lyse sur les boîtes :

– pour la dilution 10^{-3}, les plages de lyse ne peuvent pas être comptées ;

– pour la dilution 10^{-4}, on compte 160 plages de lyse.

Calculer le nombre de bactériophages contenus dans 1 mL de filtrat de lactosérum.

7. Bactériophage SPO1 de *B. subtilis*

Le bactériophage SPO1 est un phage virulent pour *B. subtilis*.

1. Définir les termes « bactériophage » et « bactériophage virulent ».

2. À l'aide de schémas légendés, étudier les différentes étapes de l'infection de *B. subtilis* par ce bactériophage.

3. Une suspension de *B. subtilis* est mise en présence de lysozyme en milieu saccharosé (2 mol·L^{-1}). Les bactéries ne peuvent pas être infectées par le phage. Pourquoi ?

Copyrighted material

8. Rétrovirus

1. Chez les rétrovirus, quelle est la nature du génome présent dans le virion ?

2. Présenter les principales étapes de leur cycle de multiplication.

9. Structure et multiplication du virus de la rage

Le virus de la rage appartient à la famille des *Rhabdoviridae*. C'est un virus enveloppé en forme d'obus, de symétrie hélicoïdale, à ARN monocaténaire non fragmenté de polarité négative. Son enveloppe est hérissée de spicules.

1. Structure.

1.1. Proposer un schéma annoté de l'architecture d'une telle particule virale.

1.2. L'ARN monocaténaire est un élément de base de la particule virale. Préciser la nature biochimique des autres structures de la particule virale.

2. Cycle de multiplication.

2.1. Citer les différents modes de pénétration possibles d'un virus enveloppé dans une cellule cible.

2.2. Décrire les différentes étapes de la multiplication d'un tel virus.

2.3. Décrire brièvement le mécanisme de libération des virions matures.

Copyrighted mater

CORRIGÉS

1. Compléter par.

1. Identiques, unités de structure ou capsomères.
2. Cubique.
3. Le sang.
4. Bactérie, l'infection lytique.
5. Descendance, lysogènes.
6. Encéphalite, mortelle.
7. Infectieux.
8. Parasitisme.
9. D'acide nucléique.
10. Chromosome, bactériophage.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : c'est la cellule hôte qui fournie l'énergie nécessaire au virus.
2. Faux : ils ont la forme d'un icosaèdre.
3. Vrai.
4. Faux : ils sont étroitement spécifiques d'une espèce précise (c'est pour cette raison que l'on peut faire un lysotypage).
5. Vrai.
6. Vrai.
7. Faux : c'est l'ADN d'un phage intégré dans le chromosome bactérien.
8. Vrai.
9. Faux : seul le hasard permet les rencontres.
10. Vrai.

3. Bactériophage tempéré chez *E. coli*

1. Un « bactériophage tempéré » est un phage qui, lors de l'infection de la bactérie, n'entraîne pas obligatoirement un cycle lytique et dont l'acide nucléique peut s'intégrer dans le chromosome bactérien (voir chap. VIII, § 2.3.4. et 2.3.3.2).

2. L'infection se traduit par la lysogénie, l'ADN du phage va s'intégrer dans le chromosome de la bactérie sans produire immédiatement une multiplication du virus et la lyse cellulaire (voir chap. VIII, § 2.3.4.1).

3. Il faut d'abord une induction (par des UV par exemple) qui sera suivie de la libération de l'ADN phagique du chromosome, puis un cycle lytique analogue à celui d'un phage virulent se développe (voir chap. VIII, § 2.3.3.2, 2.3.3.3 et 2.3.4.2).

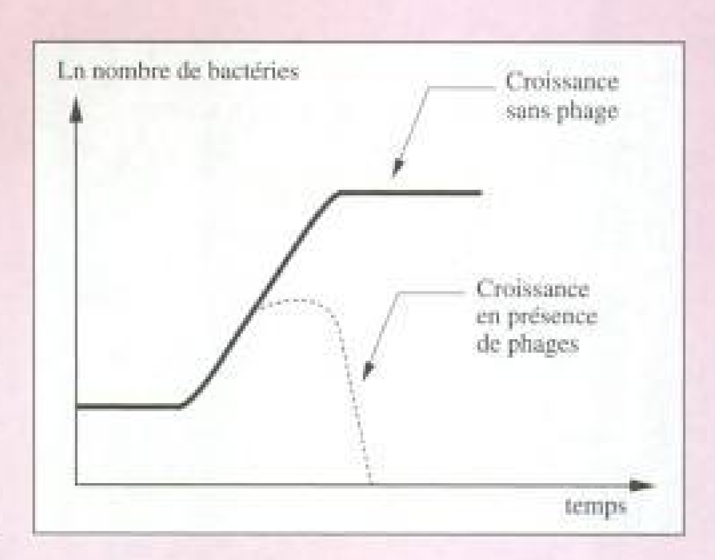
4. Action des bactériophages sur les salmonelles

1.1. L'ADN du phage est intégré dans le génome bactérien et certains de ses gènes sont traduits, d'où la présence de nouveaux antigènes à la surface de la bactérie (voir chap. VIII, § 2.3.4.3).

1.2. C'est le phénomène de conversion lysogénique par un phage tempéré.

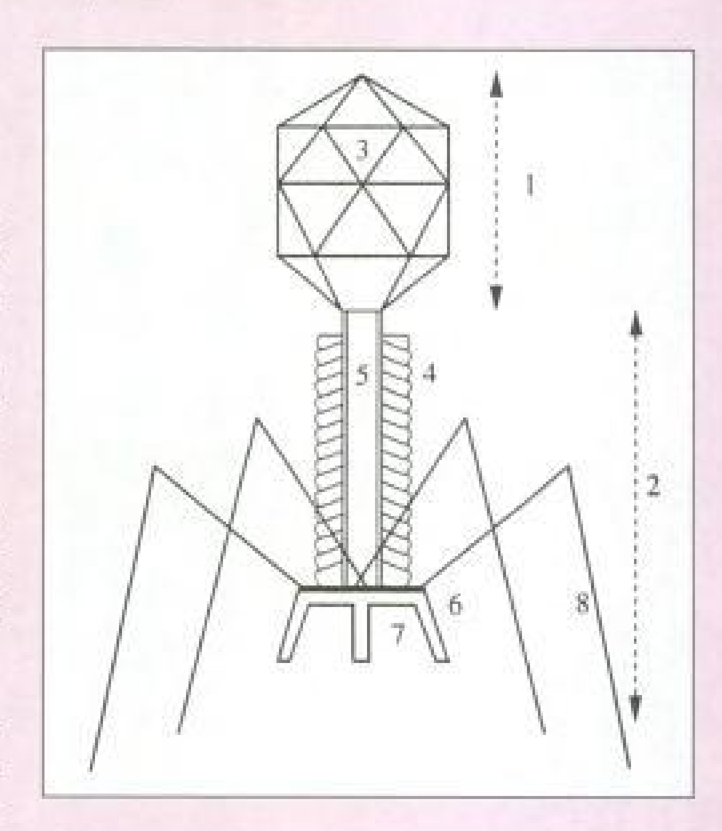
2.1. C'est le cycle lytique par un phage virulent (voir chap. VIII, § 2.3.3).

2.2. Figure ci-dessous.



5. Le bactériophage T_2

1. Sur le schéma, il faut écrire : 1 : tête, 2 : queue : 3 : capsomères, 4 : gaine rétractile, 5 : canal caudal, 6 : plaque caudale, 7 : spicules, 8 : fibres caudales.



2. Pour le schéma, (voir chap. VIII, fig. VIII-14 et VIII-15).

Copyrighted material

6. Bactériophages de lactobacilles

1. 1 : tête, 2 : queue : 3 : capsomères, 4 : acide nucléique, 5 : jonction entre la tête et la queue, 6 : gaine rétractile, 7 : canal caudal, 8 : plaque caudale.

2. Voir cycle, chap. VIII, § 2.3.3.

3. $160 \times 10^4 \times 25 = 4.10^7$ phages par millilitre.

7. Bactériophage SP01 de *B. subtilis*

1. Bactériophage : virus spécifique des bactéries ; bactériophage virulent : phage qui induit un cycle lytique se traduisant par la multiplication du virus et la lyse de la bactérie (voir chap. VIII, § 2.3.3.1).

2. Voir le cycle du phage T_2 (voir chap. VIII, § 2.3.3.1., 2.3.3.2. et 2.3.3.3).

3. Le lysozyme en milieu saccharosé détruit les parois et transforme les bactéries en protoplastes ; ceux-ci, n'ayant plus les sites de fixation du phage (récepteurs qui se trouvent au niveau de la paroi), ne peuvent être attaqués par les phages.

8. Rétrovirus

1. Un ARN.

2. Le virus est fixé par la cellule grâce à des récepteurs membranaires et aux propriétés hémagglutinantes du virus par ses spicules, par endocytose. L'ARN, dit ARN^+, est copié en ADN monobrin par une transcriptase dite inverse. Cet ADN se duplique pour devenir bicaténaire et va s'intégrer ensuite dans le génome cellulaire. L'ADN viral intégré est alors transcrit par l'ARN polymérase cellulaire en donnant un grand nombre de copies d'ARN viral. Ces molécules d'ARN sont traduites en protéines capsidales et en transcriptase inverse. L'assemblage a ensuite lieu pour donner des « virions » qui bourgeonnent à la surface cellulaire et sont exocytés.

9. Structure et multiplication du virus de la rage

1.1. Voir fig. VIII-2a.

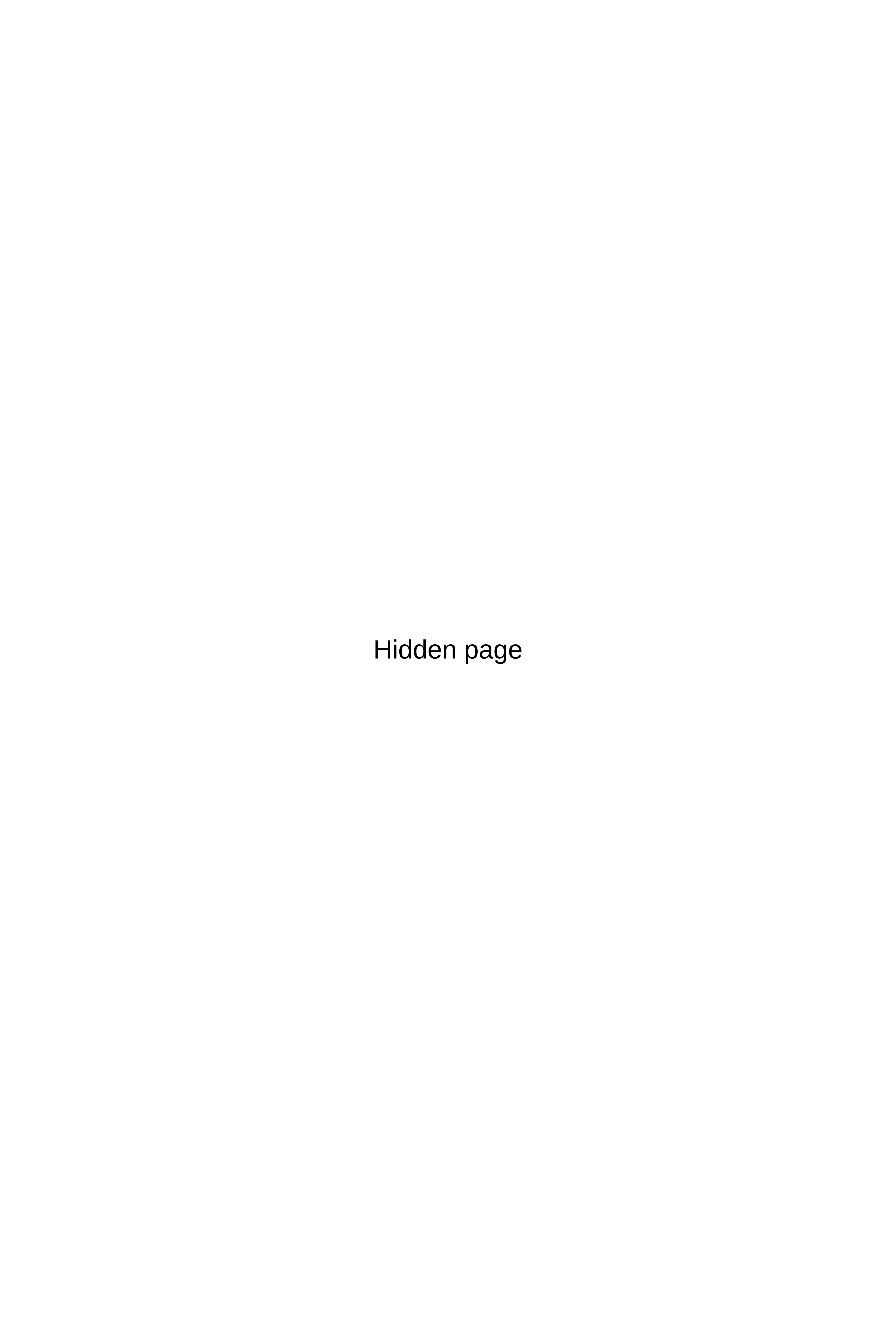
1.2. Protéines capsidales, enveloppe hémagglutinante (spicules), transcriptase inverse.

2.1. Adsorption et phagocytose, adhésion et endocytose.

2.2. Les glycoprotéines des spicules s'intègrent dans la couche externe de la membrane cellulaire. Protéine virale et nucléocapside viennent alors bourgeonner en surface de la membrane. Les bourgeons se forment puis sont expulsés et l'intégrité membranaire est aussitôt restaurée.

2.3. Voir 2.2.1.2.

Copyrighted material


Hidden page

Chapitre 9

Les risques biologiques et la sécurité microbiologique

Les risques biologiques et les sources de contamination sont liés d'abord à l'exposition à des agents pathogènes, que ceux-ci soient ou non ou recombinés (études, cultures ou productions en masse), mais également aux produits biologiques contaminés (organes, sang et autres liquides biologiques), aux cultures et manipulations cellulaires (fusion, transfection), ainsi qu'à l'expérimentation animale *(tab. IX.1 et IX.2)*.

Le sang humain et ses dérivés présentent une grande importance dans les infections spécifiques actuelles de laboratoire : l'hépatite virale B est la plus fréquente (même si la prévention existe), mais les hépatites non-A et non-B ainsi que le SIDA, pour lesquels il n'y a pas encore de traitement curatif, sont les plus redoutables.

1. Risques biologiques

1.1. Voies de contamination

Les voies de contamination les plus fréquentes sont les suivantes.

1.1.1. Voie cutanée ou percutanée

Parmi les accidents ou incidents les plus fréquents se trouvent les piqûres lors d'utilisation de seringues avec aiguilles pour injections, les coupures ou seulement les égratignures par du matériel contaminé (scalpel ou instrument, verrerie ébréchée ou cassée, etc.), les projections ou les contacts avec une peau lésée (écorchures, eczéma, brûlure…), les morsures ou griffures animales (y compris les arthropodes).

Les risques liés aux éclaboussures accidentelles (renversement d'une culture) ou systématique (goutte à l'extrémité d'une pipette) ou encore aux souillures des mains par le téléphone, les robinets de lavabo, les serviettes, etc. peuvent être également graves surtout par leur caractère insidieux.

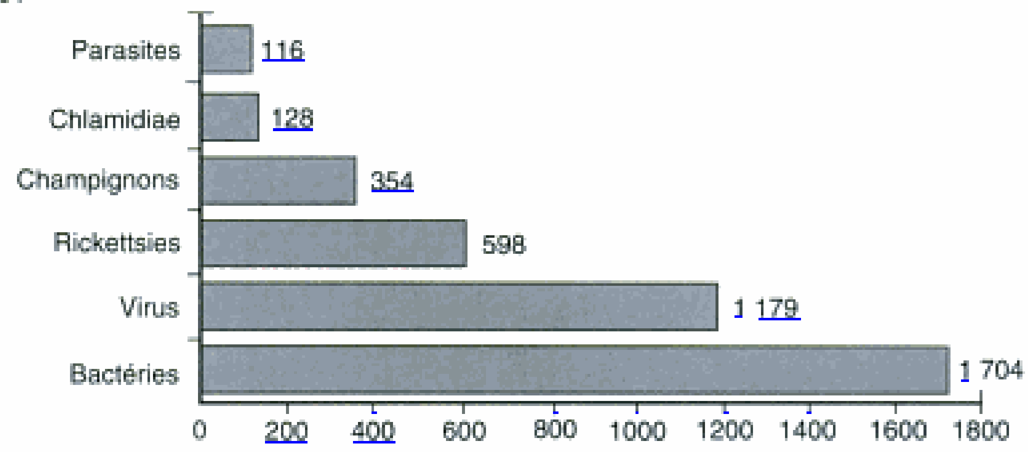
1.1.2. Voie conjonctivale

Cette voie peut-être à l'origine d'infections graves. La projection de matériel biologique contaminé dans l'œil (par des éclaboussures ou des aérosols) mais aussi des oculaires contaminés de microscope sont les causes les plus fréquentes de ce type d'infection.

Copyrighted material

Tableau IX.1 – Contamination au laboratoire dues à divers micro-organismes *(d'après Pike, 1978)*.

a. Nombre de cas :



b. Nombre de décès parmi les cas de contaminations :

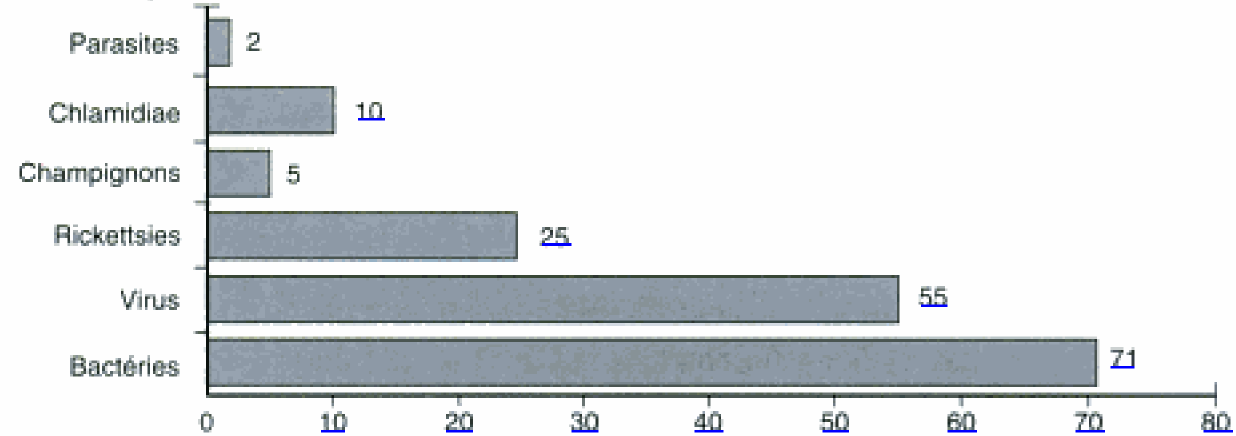
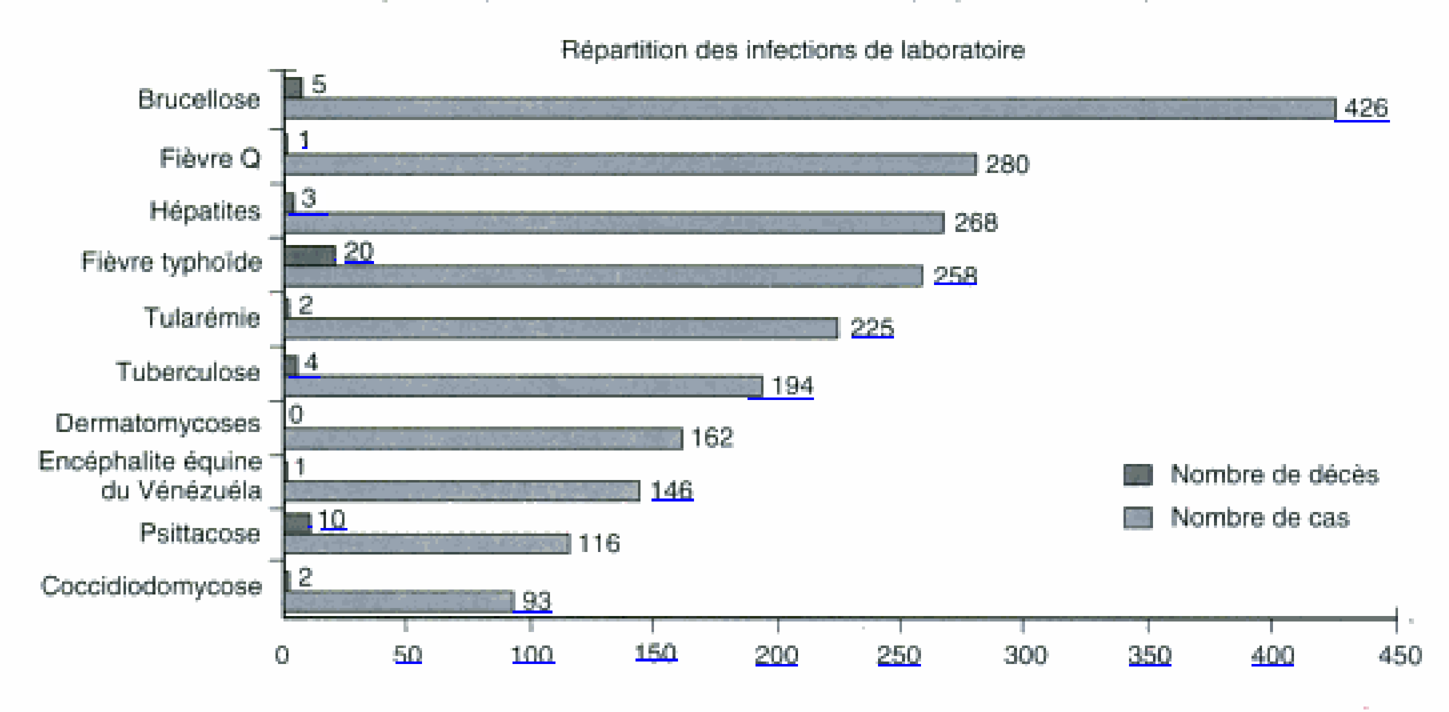


Tableau IX.2 – Infections les plus fréquentes contractées au laboratoire *(d'après Pike, 1978)*.



1.1.3. Voie respiratoire ou aérienne

De nombreux travaux produisent des aérosols *(fig. IX.1)*. Sont particulièrement visés les opérations de centrifugation, de manipulation de liquides (pipetage, broyage, agitation), de flambage de l'anse ou de la spatule, d'ouverture d'ampoules sous vide ou de tubes de cultures, d'ensemencements de boîtes de Pétri ainsi que le travail sous hotte.

Par leur propagation, les aérosols peuvent atteindre plusieurs personnes par inhalation ; le plan de travail et les mains du manipulateur subiront également une forte contamination.

L'effet de l'aérosol dépend de la concentration en agents infectieux, de sa force d'émission et de sa vitesse de retombée ou de sa persistance dans l'air.

1.1.4. Voie orale

Elle est le plus souvent la conséquence du non-respect des règles élémentaires de bonnes pratiques de laboratoire (pipetage à la bouche, absence de gants) mais aussi du défaut d'hygiène (l'alimentation ou la contamination par la cigarette, le port des mains à la bouche, l'onychophagie, le port de blouse souillée hors du laboratoire ou de la zone de travail).

1.1.5. Conclusion

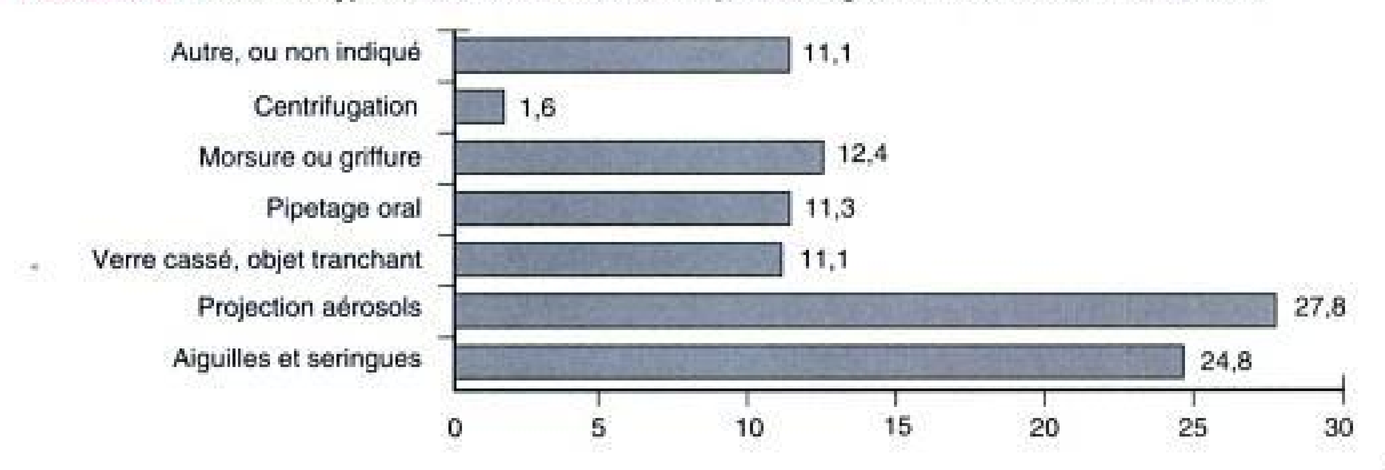
Le mode de contamination est lié au mode de transmission et la gravité de l'infection dépend du degré de virulence de l'agent en cause (par exemple, voie transcutanée pour l'hépatite B, voie aérienne ou digestive pour *M. tuberculosis*, voie aérienne pour les spores de champignons, voie digestive pour les entérovirus ou les entérobactéries).

Dans près de 80 % des cas, le mode exact de contamination est difficile à déterminer de façon précise. L'exposition à des aérosols est un mode particulièrement fréquent *(tab. IX.3 et IX.4)*.



Figure IX.1 – Aérosol résultant de l'expulsion de la dernière goutte de liquide hors d'une pipette.
(Photo Johansson Ferris, 1946)

Tableau IX.3 – Différents types d'accidents retrouvés en pourcentage sur une série de 371 accidents.



Copyrighted material

Tableau IX.4 – Les grands groupes de facteurs des risques biologiques au laboratoire.

Les modes de transmission : ☞	contact direct	contact indirect	aérosols	cultures	vecteurs
Les modes de contamination : ☞	ingestion	inhalation	inoculation	percutanée	morsure ou piqûres
Les facteurs déterminant l'infection : ☞	pouvoir pathogène spécifique, virulence	dose infectante	voie de pénétration	réceptivité de l'hôte	réaction allergique immuno-déficience
Les facteurs de l'environnement : ☞	ventilation	équipements	techniques de travail	propreté, hygiène	promiscuité

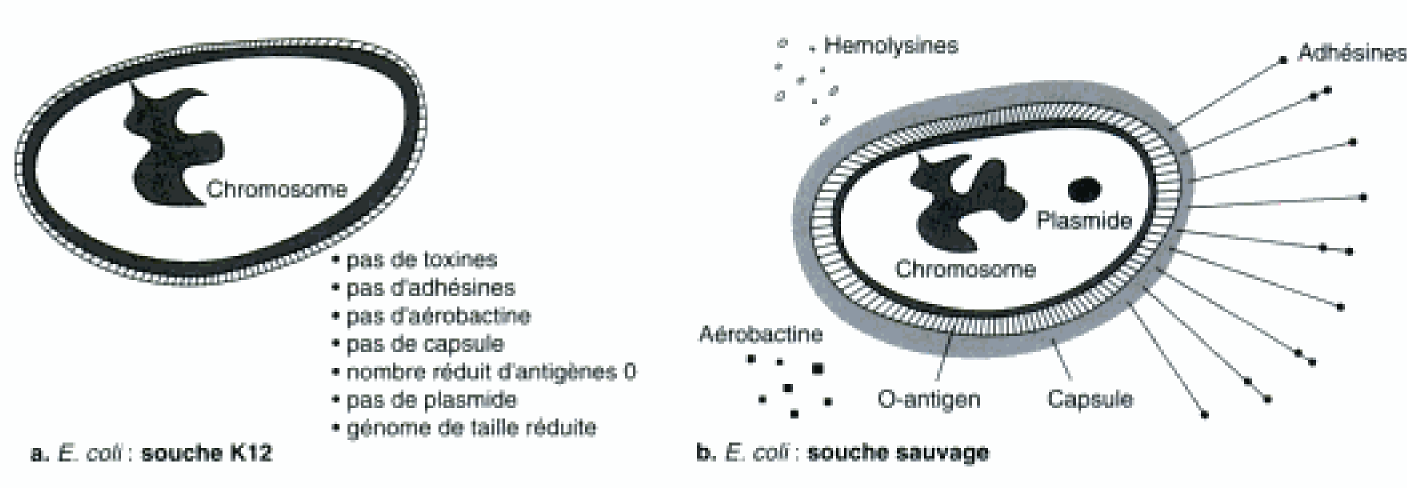


Figure IX.2 – *Escherichia coli* : comparaison entre une souche sauvage et le mutant K_{12} utilisé dans les laboratoires de recherche.

1.2. Différentes classes de micro-organismes et de cellules

Les micro-organismes sont classés en fonction du degré de leur pouvoir pathogène. En France, l'AFNOR (Association Française de Normalisation) a repris, parmi les nombreuses classifications (peu différentes les unes des autres), celle présentée par l'EFB (European Federation of Biotechnology).

1.2.1. Micro-organismes de classe 1

Ceux qui ne présentent aucun danger particulier pour l'homme et l'environnement sont les micro-organismes saprophytes banals et, d'une manière générale, toutes bactéries, et tous champignons et virus à l'exception de ceux désignés dans les autres classes ou dont l'étude est légalement interdite. *E. coli* K_{12} *(fig. IX.2)*, *Sc. cerevisiae, Acetobacter acetii,* les bactéries lactiques et les champignons utilisés dans l'industrie laitière appartiennent à la classe 1 de même que les lignées cellulaires d'origine définie et ne comportant pas de virus ni de mycoplasme (par exemple, cellules CHO, Hela, Vero).

1.2.2. Micro-organismes de classe 2

Ils sont pathogènes à la suite d'inoculation par voie cutanée, par ingestion et par voie respiratoire mais ils peuvent être manipulés sans risques par des biologistes compétents ; ils présentent un risque modéré pour le manipulateur, limité et faible pour la communauté. Des moyens prophylactiques et/ou des traitements efficaces existent. D'une manière générale, la plupart des espèces pathogènes (humaines ou animales) de pratique

Copyrighted material

Tableau IX.5 – Risque potentiel des différentes classes de micro-organismes pour l'homme.

Classe	Danger pour le personnel	Risque de propagation dans la population	Traitement possible (en général)
1	–	–	inutile
2	+	–	++
3	++	+	+/–
4	+++	++	–

courante se trouvent dans cette classe. Tous les virus isolés chez l'homme sont considérés comme appartenant au moins à la classe 2.

Pour les parasites, le classement correspond au niveau de danger présenté par le(s) stade(s) infectieux. Les préparations microscopiques exemptes de stades infectieux ne nécessitent pas le niveau de confinement indiqué. En classe 2, on trouve notamment *Leishmania tropica, Loa loa, Schistosoma, Taenia saginata, Toxoplasma, Trichomonas vaginalis, Trichostrongylus* spp., *Trypanosoma*.

Les cellules (en particulier les hybridomes), les échantillons de sang et d'organes d'individus sains sont au minimum en classe 2.

Parmi les bactéries, les principales espèces de la classe 2 sont : *Bordetella, Borrelia* spp., *Campylobacter, Cl. tetani, C. diphteriae, Edwardsiella, Enterobacter aerogenes, E. coli* (exclusivement les souches reconnues pathogènes), *Flavobacterium meningosepticum, Hæmophilus, Klebsiella, Legionella* spp., *Listeria monocytogenes, My. pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pasteurella* spp., *Proteus, Ps. aeruginosa, St. aureus, Streptococcus* spp., *Treponema pallidum, V. cholerae* (y compris *El Tor*), *Y. enterocolitica, Bacteroides fragilis,* divers *Nocardia*.

Chez les champignons, les principales espèces appartenant à la classe 2 sont : *A. fumigatus, Ca. albicans, Cryptococcus neoformans, Trichophyton* spp., *Microsporum* spp.

1.2.3. Micro-organismes de classe 3

Ce sont des micro-organismes pathogènes à haut risque, ne devant être manipulés que par des microbiologistes spécialement formés et vaccinés (si le vaccin existe). Ils constituent un danger sérieux pour la santé du personnel de laboratoire et peuvent représenter un risque pour la population en général. Des moyens prophylactiques et/ou des traitements efficaces existent généralement mais pas systématiquement.

Parmi ces agents pathogènes se trouvent les *Brucella*, des mycobactéries (humaines, bovines), *B. anthracis, Francisella tularensis, Y. pestis, Histoplasma, Coccidioides* ainsi que certains virus (arbovirus, virus rabique, fièvre aphteuse, hépatite B, HTLV-1 et 2, VIH).

1.2.4. Micro-organismes de classe 4

Ces micro-organismes provoquent des maladies graves chez l'homme et représentent un danger important pour le personnel de laboratoire et la collectivité en général. On ne dispose généralement pas de moyens prophylactiques ni de traitement efficace ; le risque de propagation est élevé.

Classe comprenant uniquement des virus (agents de fièvres hémorragiques : Lassa, Machupo, Crimée, Congo, virus de Marburg, d'Omsk ; des poxvirus, les virus encéphalitiques) qui ne peuvent être manipulés que par du personnel particulièrement averti et avec des consignes de sécurité spécifiques.

La norme AFNOR NF X-42-040 donne la liste des espèces microbiennes communément reconnues pathogènes pour l'homme (1990). Il existe également une liste établie et publiée en 1992 par la CEE.

1.2.5. Groupe E (risque pour l'environnement)

Ce groupe contient les micro-organismes qui représentent une menace plus importante pour l'environnement que pour l'homme. Ils peuvent être responsables de lourdes pertes économiques.

Copyrighted material

2.2. Bonnes pratiques de laboratoire

C'est à la fin des années 1970 (1978-1979) que la Food and Drug Administration (FDA) édicte les premiers textes traitant des bonnes pratiques de laboratoire (*good laboratory practices*, GLP). En 1981, l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) reprend les textes à son compte pour en réaliser une édition officielle et légale. En 1993, ces textes sont complétés pour traiter des méthodes automatisées (GALP : *good automated laboratory practices*) puis, en 1999, des méthodes d'analyses (GBEA : guide des bonnes exécutions d'analyses).

Présentés sous forme d'un guide, ces textes traitent des procédures à suivre lors de la réalisation de techniques de laboratoire, afin d'en assurer la fiabilité, mais aussi des règles de sécurité inhérentes à ces pratiques.

Il faut prendre un certain nombre de précautions qui doivent permettre de minimiser le risque de contamination. Ainsi, dans un laboratoire microbiologique de base (où l'on travaille avec des organismes de classe 1 ou 2 présentant un risque faible ou modéré pour le personnel et un risque très limité pour la communauté), les règles pour maîtriser les risques sont les suivantes.

On interdira :

– l'accès du laboratoire à toute personne sans obligation professionnelle d'y être ;
– de pipetter par aspiration buccale ;
– de fumer, boire, manger ou se maquiller ;
– de stocker des aliments dans la zone de travail ;
– de travailler en tenue de ville.

On évitera :

– de manipuler à mains nues ;
– de se piquer et de se couper ;
– de produire des aérosols ;
– de procéder à des manipulations dangereuses sans protection.

On recommandera :

– d'ôter sa blouse pour sortir du laboratoire ;
– de se laver les mains aussi fréquemment que cela est nécessaire ;
– de se rappeler que tous les objets usuels que l'on touche (poignée de porte, téléphone, crayons…) avec des gants contaminés deviennent à leur tour des sources de contamination ;
– d'avoir une surface de travail propre, nette et dégagée de tout matériel inutile ;
– de décontaminer la surface de travail au moins une fois par jour et à chaque danger potentiel ;
– de décontaminer tous les liquides ou matériels contaminés (autoclavage ou incinération) ;
– d'étiqueter le matériel, les cultures et les sacs de déchets pour les NSB2 (voir ci-après) et au-dessus ;
– de mettre en place un programme de désinsectisation, d'éviter la présence d'animaux ne servant pas aux expériences ;
– d'afficher à la porte du laboratoire le type auquel il appartient ;
– de signaler immédiatement tout accident ou exposition au matériel infecté, de mettre en place le cas échéant un traitement et une surveillance médicale.

On se rappellera que toute négligence peut provoquer la contamination des personnes de l'entourage et de l'environnement.

Le responsable du laboratoire veillera à la bonne formation du personnel et organisera périodiquement des sessions de formation et d'information, en particulier lors de l'introduction de nouvelles techniques.

2.3. Niveaux de sécurité

Aux différentes classes précédentes de micro-organismes correspondent des niveaux de sécurité biologique à appliquer pour leur manipulation. En fonction des risques, quatre niveaux de sécurité ont été définis.

2.3.1. Niveau de sécurité biologique 1 (NSB1)

Ce niveau concerne les laboratoires de biologie et de microbiologie n'utilisant que des micro-organismes de classe 1. Le NSB1 n'exige pas d'équipement particulier de confinement biologique pour la protection des opérateurs ; les hottes à flux laminaire ne sont généralement utilisées que pour protéger les manipulations qui y sont réalisées.

Copyrighted material

Tableau IX.6 – Liste pour le contrôle des principales mesures de sécurité d'un laboratoire.

	NSB1	NSB2	NSB3	NSB4
Locaux délimités et isolés	**éventuellement**	**oui**	oui	oui, si possible bâtiment particulier
Système clos pour les cultures	∅	**oui**	oui	oui
Marquage	∅	**éventuellement**	oui	oui
Portes et fenêtres	**ordinaires**	**fermées pendant le travail**	closes	hermétiques verre incassable
Aération évitant la contamination de l'extérieur	∅	∅	éventuellement	oui
Local en dépression	∅	∅	> 30Pa	30-50 Pa par étage
Air entrant et extrait filtré	∅	∅	oui	oui
Contrôle des accès	∅	**autorisation**	restreint par sas	uniquement les actifs par sas
Matériel pour la décontamination des personnes	**évier à proximité**	**évier dans le laboratoire et désinfectant**	sas, douche, évier dans le laboratoire et désinfectant	sas, douche, désinfectant, évier dans chaque salle
Prendre une douche à la sortie	∅	∅	éventuellement	oui
Recueil et inactivation des eaux usées	∅	∅	éventuellement	oui
Vêtement de protection	**éventuellement**	**blouse**	oui avec changement	combinaison intégrale
PSM	**éventuellement**	**classe 1 ou 2**	classe 2 ou 3	classe 3
Stérilisateur	**disponible**	**dans le bâtiment**	dans le laboratoire	sas à double entrée au laboratoire
Destruction de la biomasse	**éventuellement**	**inactivation**	inactivation au laboratoire	réservoir de destruction, vérification de l'effet
Entretien du laboratoire	∅	**sur autorisation : désinfection**	sur autorisation : inactivation	sur autorisation : inactivation

∅ : aucune mesure particulière, NSB : niveau de sécurité biologique.

Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être connues et appliquées (tout particulièrement : nettoyage quotidien des paillasses, décontamination des déchets, port de la blouse, interdiction du pipetage à la bouche, de boire, fumer, manger et se maquiller, stricte hygiène des mains avant de quitter le laboratoire).

2.3.2. Niveau de sécurité biologique 2 (NSB2)

Le NSB2 est applicable pour les travaux portant sur des agents au risque potentiel modéré pour le personnel et l'environnement.

Dans le laboratoire NSB2 seront effectués les travaux portant essentiellement sur les agents pathogènes de classe 2. On privilégiera, dès ce niveau de sécurité, la protection des voies de pénétration dans l'organisme, en particulier pour les risques liés aux aérosols. Les agents de classe 1 peuvent *a fortiori* y être manipulés.

L'équipement de base est le même que pour le niveau 1 avec en plus, entre autres, la présence d'un autoclave dans le laboratoire et de PSM répondant à la norme NF X-44-201, type I ou type II. Les opérations suivantes seront obligatoirement réalisées sous un PSM :

Copyrighted material

– toutes les techniques réalisées sans ou hors confinement primaire produisant des aérosols tels que la centrifugation, le broyage, le mixage, l'ouverture d'ampoule lyophilisée, le mélange, l'agitation, l'utilisation d'ultrasons, l'ouverture de conteneurs de matériel infectieux dont la pression interne peut être différente de la pression ambiante et l'inoculation d'un animal par voie nasale. Pour la centrifugation, on utilisera un rotor hermétiquement fermé (système « aérosol *free* ») et des tubes de sécurité. Le remplissage, la fermeture et l'ouverture des tubes doivent s'effectuer sous PSM ;

– lorsque de fortes concentrations ou de grands volumes d'agents infectieux sont manipulés hors confinement primaire.

Le mode d'emploi et les limites de ces postes seront expliqués à tous les utilisateurs.

2.3.3. Niveau de sécurité biologique 3 (NSB3)

Le NSB3 doit s'appliquer aux structures dans lesquelles sont manipulés des agents qui peuvent entraîner des pathologies graves ou être potentiellement létaux.

Il correspond à un laboratoire de confinement strict où seront utilisés des agents infectieux de classe 3. Ce laboratoire est en dépression (quelques millimètres CE [colonne d'eau]). On y accède par un sas en pression positive par rapport au laboratoire ; l'air est filtré en sortie sur filtres HEPA (*high efficiency particule air*), sans recyclage.

Le personnel appelé à travailler dans le NSB3 doit avoir une formation spécifique et une tenue adaptée (port d'une blouse spéciale, surbottes, gants, masque, lunettes de protection).

Tableau IX.7 – Mesures de protection vestimentaire en fonction du niveau de sécurité.

Niveau de sécurité	NSB1	NSB2	NSB3	NSB4
Protection oculaire	∅	éventuellement	pour certains travaux	pour certains travaux
Lavage ou protection des cheveux	∅	∅	éventuellement	obligatoire
Masque buccal	∅	éventuellement	obligatoire	obligatoire
Blouse	recommandée	obligatoire	obligatoire	obligatoire
Gants	éventuellement	obligatoire	obligatoire	obligatoire
Souliers spéciaux	∅	éventuellement	obligatoire	obligatoire

∅ : aucune mesure particulière.

Tableau IX.8 – Sommaire des principales mesures de sécurité en fonction du niveau.

Niveau de sécurité	BPL	Équipements de sécurité
1	Celle du laboratoire de microbiologie standard	Équipement de base de tout laboratoire (extincteurs…)
2	Niveau 1 plus : blouse, décontamination des déchets, accès au laboratoire limité, marquage avec le symbole « danger biologique »	Éventuellement des PSM de classe I ou II, mécanisations des manipulations réduire les risques d'aérosol
3	Niveau 2 plus : vêtements spéciaux, accès contrôlé	PSM de classe I ou II pour toutes les manipulation de matériels infectieux pression négative
4	Niveau 3 plus : sas d'accès avec changement de tenue spéciale, douche à la sortie, inactivation de tous les déchets et produits sortants	PSM de classe III, combinaison totale différence de pression d'air autoclave double entrée

Copyrighted material

2.4.1.1. *Instructions générales*

Tous les intervenants (y compris le personnel de nettoyage, d'entretien ou de réparation) doivent être informés des dangers et des mesures de protection à prendre lors de l'exposition aux agents biologiques. Cette information doit être donnée avant la première prise de service et rappelée régulièrement.

Le contenu de toutes les instructions doit être consigné par écrit et signé par les personnes concernées.

Il peut être utile de réaliser des démonstrations pratiques ou des entraînements sous la direction de personnes compétentes. Un contrôle périodique (par exemple sous la forme de questionnaires) peut être envisagé.

2.4.1.2. *Directives de travail*

Si les agents biologiques manipulés présentent des dangers graves pour la santé, il est nécessaire de mettre au point des directives de travail et de les faire connaître aux personnes concernées. Ces directives doivent mentionner les effets de l'agent biologique sur l'homme, donner les indications sur la manipulation (en particulier les étapes de la manipulation), préciser les mesures de protection ainsi que de nettoyage et de désinfection. Elles doivent être comprises.

2.4.1.3. *En cas d'accident*

Des plans d'évacuation et de secours doivent être affichés à des endroits précis accessibles à tous. Ils doivent aussi donner des indications simples en cas d'incidents divers comme :

– une émission de matériel biologique potentiellement contaminant ;
– un accident ;
– un incendie.

Doivent y figurer :

– les numéros de téléphone du responsable du laboratoire et du responsable de la sécurité ;
– les numéros de téléphone des services de secours ;
– les indications sur les alarmes, sorties de secours, lieux de regroupement, contrôle de présence, mesures de sécurité, combat de l'incendie.

Un exercice doit être réalisé régulièrement en choisissant un thème : incendie, bris de culture, etc.

2.4.2. Motivation

Les mesures de sécurité et toutes les informations données en routine ne servent à rien si les personnes ne sont pas convaincues que seule leur participation active à la sécurité permettra de la rendre effective. La sécurité doit être perçue comme une nécessité évidente et comme le complément de la compétence et de la qualité du travail.

Le bon exemple des responsables (utilisation des vêtements de protection), la discussion fréquente, la prise en compte des remarques et des propositions des employés et la reconnaissance des efforts contribuent à instaurer un climat propice à un travail efficace avec une sécurité maximale.

Une attitude positive vis-à-vis de la sécurité ne s'obtient que par un entraînement régulier et une mise à jour périodique des connaissances dans ce domaine. Cet entraînement peut porter sur :

– les connaissances aussi bien fondamentales qu'appliquées aux risques biologiques ;
– les techniques, les matériels et les instruments utilisés ;
– les attitudes de travail et le comportement individuel ou collectif sur la maîtrise des risques ainsi que leur prise en compte dans le travail.

2.5. Postes de sécurité microbiologique

2.5.1. Considérations générales

L'air ambiant peut provoquer une contamination en véhiculant les poussières et les organismes vivants.

La vitesse de sédimentation des particules se réduit lorsque leur diamètre diminue. Les plus petites resteront suffisamment longtemps en suspension dans l'air et pourront être inhalées et contaminer les alvéoles pulmonaires. Il est par conséquent important de limiter la quantité d'aérosols produits, d'en assurer la rétention et de détruire les agents pathogènes contenus dans les aérosols.

La filtration de l'air permet d'obtenir une atmosphère appauvrie en particules inertes ou biologiques, mais si la plupart des filtres arrêtent les poussières qui peuvent supporter les bactéries, ils ne stoppent pas tous les micro-organismes. Il faut donc éviter le rejet d'aérosols contaminés dans

Copyrighted material

l'atmosphère. La mise en suspension d'agents pathogènes dans l'air peut se produire en particulier lors :

– du pipetage d'une culture ;

– de l'ouverture trop rapide d'un tube contenant une culture ;

– du flambage d'une anse chargée de germes ;

– d'une centrifugation avec des tubes sans couvercle ;

– du renversement d'une culture.

Pour se protéger de toute contamination, des appareils de filtration d'air, appelés enceintes de sécurité, sont à la disposition du manipulateur. Ils sont définis par un volume de travail (fermé ou ouvert) traversé par un flux d'air et équipé de filtres. Selon la conception technique, ces appareils permettent d'atteindre l'un des objectifs suivants :

– protéger la manipulation ;

– protéger le manipulateur et l'environnement ;

– protéger la manipulation, le manipulateur et l'environnement.

Selon l'objectif à atteindre, des filtres sont placés respectivement :

– en aval du ventilateur pour protéger la manipulation ;

– en amont du ventilateur pour protéger le manipulateur et l'environnement ;

– en amont et en aval du ventilateur pour protéger la manipulation, le manipulateur et l'environnement.

De façon générale, un poste de sécurité microbiologique est défini comme une enceinte ventilée destinée à assurer une protection du manipulateur, de l'environnement et, le cas échéant, du produit manipulé vis-à-vis de substances biologiquement dangereuses.

La technique du traitement de l'air en écoulement laminaire est la seule qui permette d'obtenir en un secteur donné un air d'excellente qualité, stérile, et un empoussièrement contrôlé en apportant sur le plan de travail un air filtré et en évitant la sédimentation des particules émises par les activités du manipulateur.

2.5.2. Divers types de PSM

Il existe trois types de postes de sécurité microbiologique.

2.5.2.1. PSM de type I

Le PSM de type I *(fig. IX.4)* est une enceinte constituée par une chambre de manipulation partiellement ouverte sur le devant, munie d'un dispositif d'aspiration d'air qui permet de maintenir l'enceinte en dépression. Celle-ci est destinée à assurer la protection du manipulateur par l'entraînement du flux d'air loin du manipulateur et la protection de l'environnement par évacuation du flux d'air hors de l'enceinte, à travers un filtre à très haute efficacité.

Il ne faut pas le confondre avec les enceintes à flux laminaire vertical (leur aspect étant quelquefois similaire) : le PSM ne protège pas la manipulation mais uniquement le manipulateur et l'environnement alors que les enceintes à flux laminaire vertical remplissent exactement le rôle inverse (protection de la manipulation).

2.5.2.2. PSM de type II

C'est une chambre de manipulation partiellement ouverte sur le devant, semblable aux enceintes à flux laminaire vertical à recyclage total. Le PSM se caractérise par une aspiration partielle du flux d'air à l'extérieur, au bord avant du plan de travail. La protection de l'environnement est assurée par un filtre absolu placé sur la sortie en partie haute et celle du manipulateur par un flux d'air entrant en façade avant qui compense celui rejeté à l'extérieur.

Selon le modèle choisi *(fig. IX.4)*, ces enceintes seront équipées d'un ou de deux moteurs. Dans les équipements à un seul moteur, la répartition entre le débit d'air recyclé et l'air rejeté sera fixe et proportionnelle au rapport de la section du filtre placé sur le rejet à celle du filtre placé sur l'air recyclé.

Dans les équipements à deux moteurs, on pourra utiliser et régler le débit de chacun des deux ventilateurs en fonction du degré de protection que l'on désire assurer pour le manipulateur (en règle générale, 40 % de renouvellement d'air sont nécessaires avec les PSM actuels).

Cette enceinte pourra même être utilisée comme une enceinte à recyclage total, mais elle peut présenter alors des risques pour le manipulateur si celui-ci ne contrôle pas correctement les réglages.

Le filtre assurant la protection de la manipulation est toujours placé au-dessus du plan de travail

Copyrighted material

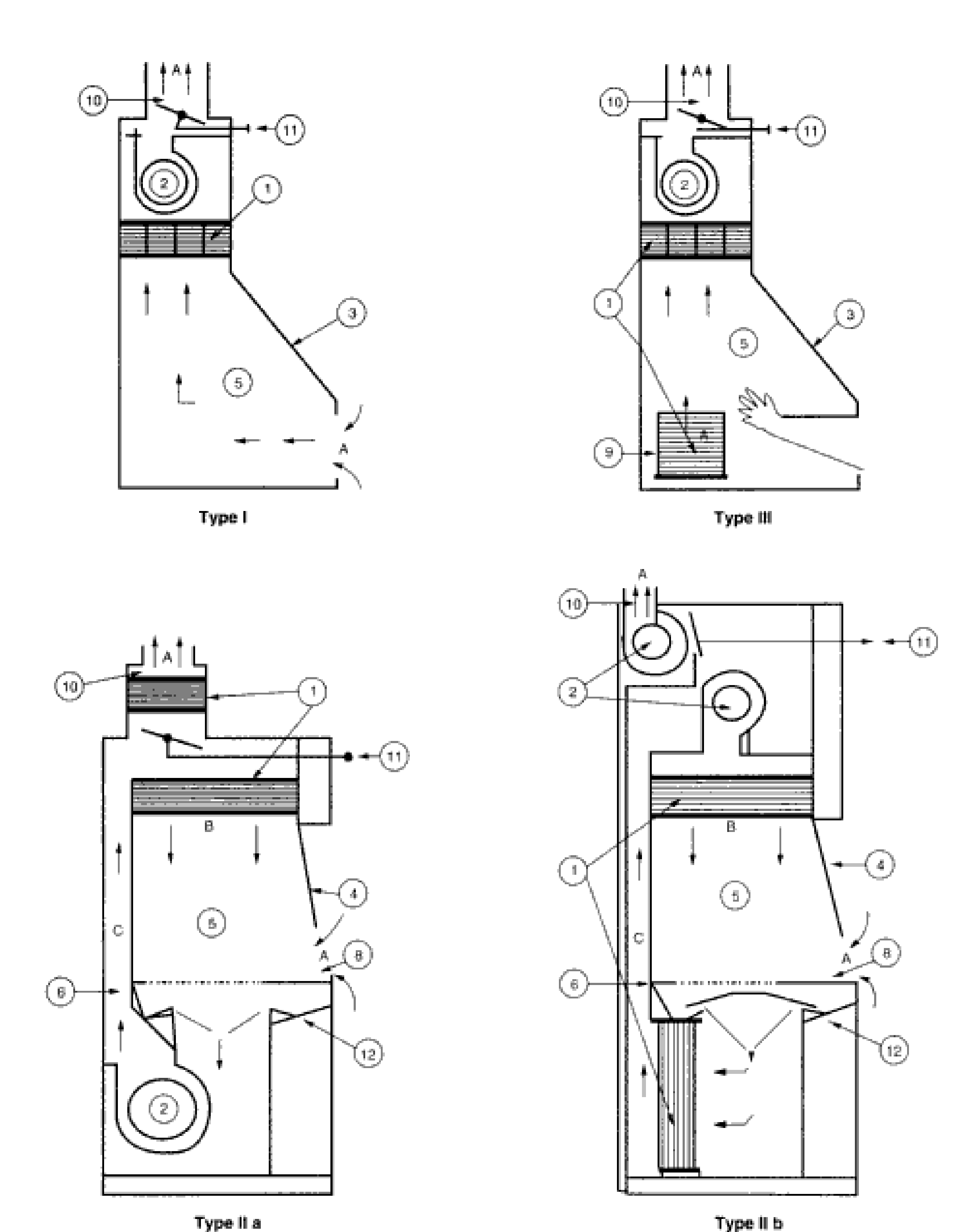
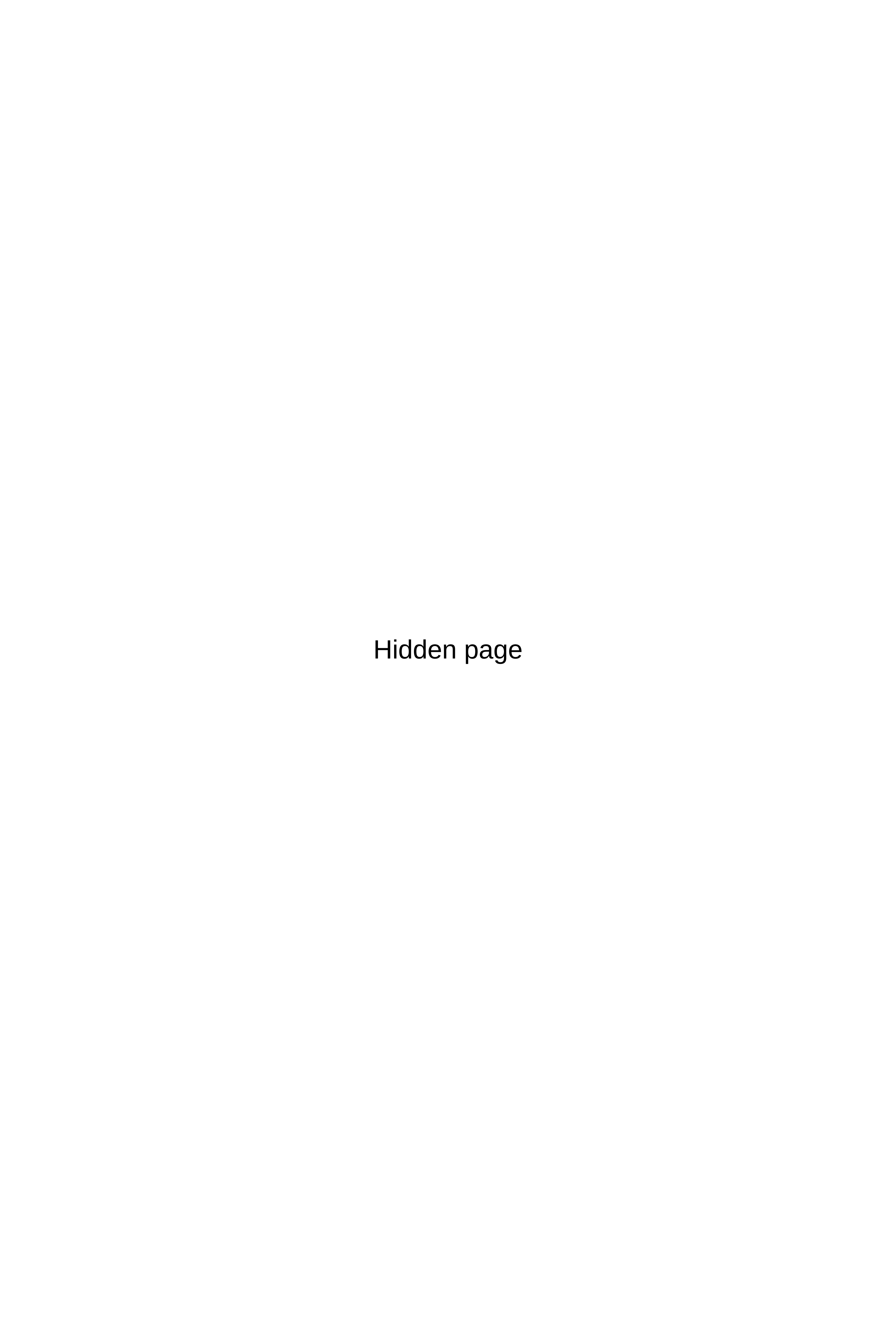


Figure IX.4 – Les divers types de PSM.

1. filtre haute efficacité (HEPA : hight efficiency particle air) ; 2. ventilateur ; 3. vitre fixe ; 4. vitre mobile ; 5. enceinte de travail ; 6. conduit d'air contaminé ; 7. conduit d'air filtré ; 8. plan de travail perforé ; 9. filtre d'admission d'air ; 10. évacuation de l'air filtré ; 11. réglage des débits ; 12. reprise des liquides (nettoyage ou liquide biologique renversé).

A : flux d'air extrait ou admis ; B : flux d'air recyclé ; C : flux d'air total (C = A + B, en général A = 40 %, B = 60 %).
→ : direction du flux d'air.

Copyrighted material


Hidden page

sateurs précédents. Les souffleries d'air chaud présentent l'inconvénient de disperser dans l'atmosphère les squames et les micro-organismes qu'elles abritent.

4.4. Décontamination du linge

Le linge constitue un agent de transmission des agents infectieux. Il est nécessaire de séparer, avant le lavage, les linges souillés des linges non contaminés du point de vue biologique.

Cette mesure de décontamination répond à deux objectifs :

– la sécurité en matière de conditions de travail ;

– l'hygiène.

L'efficacité de la décontamination dépend :

– du volume de matériel ;

– de la contamination initiale ;

– de la concentration détergente et décontaminante.

Les méthodes de lavage du linge souillé font l'objet de procédures particulières. Les textiles souillés sont envoyés à la buanderie dans des sacs étanches de couleurs différentes selon le degré de dangerosité.

Un tri a pour but de préparer l'opération de lavage en répartissant le matériel en lots homogènes, ce qui permet de réserver, à chaque type de matériel, le meilleur traitement : lavage manuel, lavage en machine.

Il s'effectue par différents procédés adaptés au but recherché :

– lavage manuel ;

– machines à laver classiques permettant de sélectionner des programmes adaptés ;

– tunnels de lavage traitant rapidement des volumes importants ;

– laveurs stérilisateurs.

Il est important de :

– respecter les dosages ;

– vérifier que l'eau n'est pas trop dure.

Le linge propre provenant de la buanderie est également vérifié.

4.5. Décontamination du matériel

Le matériel (centrifugeuses, étuves, congélateurs, etc.) peut être à l'origine d'une contamination. Il faut donc le désinfecter périodiquement.

On utilisera des désinfectants chimiques liquides (ammoniums quaternaires, eau de Javel) après s'être assuré qu'ils ne corrodent pas le matériel.

4.6. Élimination des déchets au laboratoire

Le règlement sanitaire départemental type rappelle que les déchets des établissements hospitaliers ou assimilés doivent être triés en :

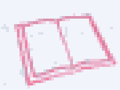
– déchets contaminés. Le matériel contaminé réutilisable sera autoclavé. Le matériel contaminé à éliminer sera autoclavé puis placé dans des récipients étanches avant d'être incinéré ;

– déchets non contaminés assimilables aux déchets ménagers.

Tout objet pouvant causer des blessures (aiguilles, seringues) sera placé dans des récipients destinés à cet effet. Les récipients pleins seront incinérés.

Copyrighted material

AUTO-ÉVALUATION ET EXERCICES



SAVEZ-VOUS VOTRE COURS ?

1. Présenter les différents types de risques biologiques et les différentes catégories de personnel exposées.

2. Citer les infections les plus fréquentes et pouvant être contractées dans les laboratoires de microbiologie, de biochimie et de biologie humaine.

3. Préciser les sources, les voies et les modes de contamination relatifs à ces pathologies.

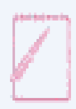
4. Indiquer les bases de la classification des agents pathogènes.

5. Donner les définitions des classes 1, 2, 3, 4 et E.

6. Citer des micro-organismes appartenant à chacune de ces classes.

7. Identifier les risques liés aux différentes étapes d'une manipulation classique de bactériologie, de biochimie ou de biologie humaine.

8. Sélectionner dans une documentation fournie les textes réglementaires, les normes ou les recommandations qui s'appliquent à la situation analysée.



EXERCICES ET PROBLÈMES

1. Compléter les propositions suivantes.

1. Par leur propagation, les aérosols peuvent contaminer plusieurs……… par………

2. Les micro-organismes sont……….. en fonction du degré de leur…………………..

3. Les échantillons de…….. et d'organes d'individus………. sont au minimum en…………..

4. Les bonnes………… de laboratoires doivent être connues et……………..

5. Au laboratoire, le nettoyage quotidien des……….. et la décontamination des………… est la règle.

6. Le port de la……… est obligatoire au laboratoire.

7. Au laboratoire, il y a interdiction du pipetage à la……., de……., ……… , ………. et se……….

8. Il faut une stricte hygiène des………. avant de quitter le laboratoire.

9. Le lavage des mains a pour objet de supprimer les……………. et d'empêcher la transmission des…………….. à d'autres personnes.

10. Le matériel contaminé à éliminer sera…………. puis placé dans des récipients……… avant d'être……………..

11. PSM signifie………………………..

12. NSB signifie………………………………

2. Indiquer si les propositions suivantes sont vraies ou fausses. Si une proposition est fausse, le justifier.

1. *E. coli* est en classe 1 et peut donc être manipulé sans précautions particulières.

2. Le virus du sida est en classe 4.

3. Les micro-organismes de classe 3 sont autorisés à la manipulation dans les lycées.

4. Un yaourt correspond à un produit biologique de risque 1.

5. Manipuler sous un PSM supprime tout risque de contamination.

6. Le port de la blouse est utile en NSB1.

7. On peut mâcher du chewing-gum dans un laboratoire NSB2.

8. L'eau de Javel et le formol sont parmi les meilleurs désinfectants.

9. Au laboratoire, le virus du sida est plus à craindre que le virus de l'hépatite B.

10. Les aérosols sont le mode de dispersion le plus courant des micro-organismes.

CORRIGÉS

1. Compléter par

1. Personnes, inhalation.

2. Classés, pouvoir pathogène.

3. Sang, sains, classe 2.

4. Pratiques, appliquées.

5. Paillasses, déchets.

6. Blouse.

7. Bouche, boire, manger, fumer, maquiller.

8. Mains.

9. Germes transitoires, germes résidants.

10. Autoclavé, étanches, incinéré.

11. Poste de sécurité microbiologique.

12. Niveau de sécurité biologique.

2. Propositions vraies ou fausses

1. Faux : seule la variété *E. coli* K12 est en classe 1, les autres sont en classe 2.

2. Faux : en classe 3.

3. Faux : seule les classes 1 et 2 sont autorisées.

4. 6. 8. Vrai.

5. Vrai, mais à condition de respecter les bonnes pratiques de laboratoire et de manipulation.

7. Faux : il est interdit de manger à cause du danger de contamination par voie orale.

9. Faux : au niveau du laboratoire c'est exactement le contraire, le nombre de contaminations par l'hépatite y est beaucoup plus important que par le sida.

10. Vrai.

Copyrighted material



MELVIN CALVIN naît le 8 avril 1911 à Saint-Paul, dans le Minnesota (États-Unis). Il fait ses études au Michigan College of Mining and Technology, à Houghton, et soutient son PhD en 1935. Il est nommé professeur en 1947 à l'université de Berkeley. C'est l'élucidation du cycle biochimique de la photosynthèse qui le rend célèbre. Il reçoit le prix Nobel en 1961 pour ses travaux. Il décède le 8 janvier 1997.



CHARLES CHAMBERLAND (1851-1908) – Physicien et biologiste français né à Chilly-leVignoble (Jura, France).
1875-1879 : en tant qu'agrégé préparateur, dans le laboratoire de L. Pasteur, il reprend une expérience réalisée par C. Bastian, partisan de la théorie de la génération spontanée, et démontre que les conclusions du médecin londonien sont erronées.
1879 : il soutient sa thèse de doctorat ès sciences physiques, *Recherches sur l'origine et le développement des organismes microscopiques*. C'est le point de départ de travaux sur la stérilisation des milieux de culture qui l'amènent à concevoir une étuve à désinfection qui porte son nom : l'autoclave Chamberland.
1880 : il prend part aux expériences de vérification du vaccin anticharbonneux.
1881 : avec L. Pasteur, E. Roux et L. Thuillier, il entreprend l'étude de la rage.
1884 : il met au point un filtre, conçu à partir d'une bougie de porcelaine poreuse de son invention, permettant d'éliminer les microbes de l'eau de boisson : le filtre Chamberland-système Pasteur. Il permettra la découverte des toxines diphtériques et tétaniques.



PAUL EHRLICH (Strehlen, 1854-Hambourg, 1915) – Biologiste allemand connu pour ses travaux pionniers en hématologie, immunologie et chimiothérapie, il naît le 14 mars 1854 à Strehlen, en Silésie (aujourd'hui Strzelin, en Pologne). En 1882, il découvre une méthode de coloration – devenue classique depuis – du bacille de Koch (responsable de la tuberculose). En 1909, il met au point un traitement de la syphilis à base d'arsenic, appelé Salvarsan ou 606, par la suite amélioré et renommé Neosalvarsan ou 912. Cette découverte apporte une reconnaissance mondiale au scientifique, déjà auréolé d'un prix Nobel de médecine attribué en 1908, en partage avec le Russe Élie Metchnikov pour ses travaux sur la biochimie de l'immunité.



SIR ALEXANDER FLEMING, fils de paysan, voit le jour le 6 août 1881 à Darvel, en Écosse, dans la ferme familiale. Il perd son père à l'âge de sept ans. Il poursuit de brillantes études à la Polytechnic School, qui l'arment pour la suite. Il accepte un poste d'employé dans une compagnie de navigation. Il y travaille durant quatre ans.
À l'âge de vingt ans, après avoir réussi les examens d'entrée de l'université de Londres, il s'inscrit à la Saint Mary's Hopital Médical School en octobre 1901.
Encore étudiant, il intègre le Service d'inoculation dans le laboratoire d'Almroth Wright.
C'est en 1928 qu'il fait sa plus grande découverte, alors qu'il étudie les staphylocoques dorés en son absence, une des boîtes de Pétri dans lesquelles il fait des cultures de bactéries est contaminée par une spore de moisissure. Il comprend vite l'intérêt du pouvoir bactéricide de la pénicilline. Cependant, il ne parvient pas à l'isoler et ce sera deux autres chercheurs de l'université d'Oxford, Howard Florey et Boris Chain, qui, en 1941, y parviendront en cristallisant la pénicilline. Le Dr Fleming est largement récompensé et reçoit le prix Nobel de médecine (1945) ainsi que la médaille du Mérite des États-Unis. Sir Alexander Fleming meurt le 11 mars 1955.

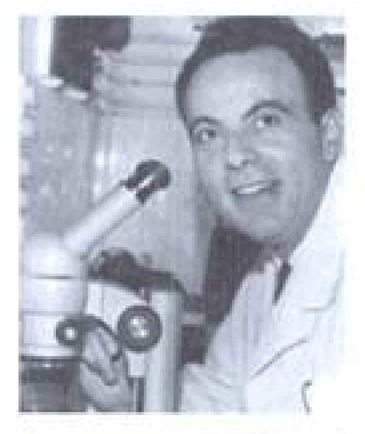
Copyrighted material



CAMILLE GUÉRIN (1872-1961) – Médecin-vétérinaire et biologiste français né à Poitiers, docteur en médecine vétérinaire en 1896.
De 1905 à 1915, il publie, en collaboration avec A. Calmette, une série de mémoires relatifs au mécanisme de l'infection tuberculeuse. En cultivant le bacille tuberculeux dans un milieu à base de bile de bœuf glycérinée, sur une assise de pomme de terre, les deux chercheurs s'aperçoivent que les cultures perdent peu à peu de leur virulence. Toutes les trois semaines, C. Guérin procède au réensemencement du bacille.
En 1915, Lille est occupée par l'armée allemande et les recherches doivent cesser.
1918-1924 : reprise des travaux sur la vaccination antituberculeuse. En 1921, après 230 passages sur milieu bilié, Calmette et Guérin parviennent à obtenir une souche de bacilles atténués, capable de conférer l'immunité. Après de nombreux essais de vaccinations BCG (bacille Calmette-Guérin) sur des bovidés et d'autres animaux, B. Weill-Hallé procède avec succès à la première vaccination humaine. Les pouvoirs publics autorisent en 1924 l'Institut Pasteur à étendre la vaccination BCG aux nouveau-nés. Des souches vaccinales sont distribuées gratuitement aux laboratoires qualifiés, français ou étrangers, qui en font la demande.



FÉLIX D'HÉRELLE (1873-1949) – Biologiste canadien d'origine française.
De 1901 à 1906, il étudie la microbiologie de manière autodidacte puis travaille comme bactériologiste sur la fièvre jaune à l'Hôpital général du Guatemala.
De 1907 à 1911, il étudie la fermentation du sisal au Mexique et isole l'agent infectieux de l'entérite des sauterelles.
Assistant de recherche dans les laboratoires de l'Institut Pasteur de 1911 à 1921, il mentionne pour la première fois les plages de lyse par des phages sur des cultures microbiennes en 1915.
En 1917, il publie ses résultats, indiquant le caractère filtrable et transférable de l'agent causal de la plage de lyse, décrit comme un organisme vivant et corpusculaire. Il le nomme bactériophage. En 1921, son livre *Le bactériophage : son rôle dans l'immunité* donne les observations et les techniques utilisées au cours de l'étude des bactériophages et postule la multiplication intracellulaire des virus.

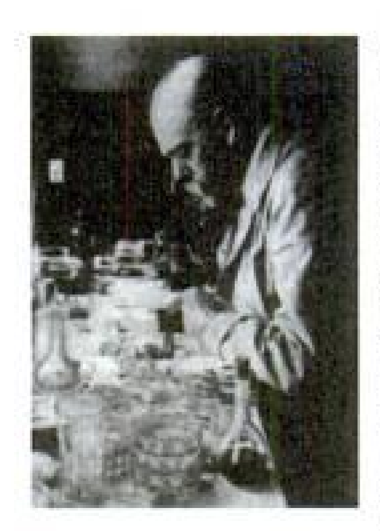


FRANÇOIS JACOB commence des études de médecine à la Faculté de Paris mais elles sont interrompues par la guerre. En juin 1940, il quitte la France et s'engage à Londres dans les Forces françaises libres. Affecté à la deuxième division blindée, il est grièvement blessé en Normandie en août 1944. Il est Compagnon de la Libération et Grand-Croix de la Légion d'honneur. Après la guerre, il termine ses études de médecine et soutient une thèse de doctorat à Paris en 1947. Ne pouvant faire de chirurgie à cause de ses blessures, il se tourne vers la biologie. Il obtient une licence (1951) puis un doctorat ès sciences (1954) à la Sorbonne. En 1956, il est nommé chef de laboratoire à l'Institut Pasteur. En 1965, il obtient le prix Nobel pour ses travaux. En 1982, Il devient président du conseil d'administration de l'Institut Pasteur.



EDWARD JENNER naît en 1749 dans le Gloucestershire, à Berkeley, où il passera pratiquement toute sa vie en tant que médecin de campagne.
Chargé de mettre en pratique une technique de variolisation mise au point par Robert Sutton en 1768, il apprend, en discutant avec ses patients, l'existence d'une bien étrange croyance populaire. Beaucoup de filles de laiterie et de livreurs de lait pensent alors qu'attraper la variole des vaches les préserve de celle des humains. En 1796, il inocule la vaccine à un garçon de 8 ans. L'enfant tombe malade puis guérit très vite. Trois mois plus tard, on lui inocule la variole et cela n'aura aucun effet sur lui. La pratique de la vaccination s'étend rapidement et, dès 1801, des centres spécialisés s'ouvrent en Europe et en Amérique du Nord. Jenner appelle la matière qui provoque la variole des vaches « virus » et pose ainsi les premières bases de ce qui sera l'immunologie.

Copyrighted material



ROBERT KOCH est né à Clausthal (Hanovre) en 1843, il étudie les mathématiques, les sciences naturelles et la médecine à Göttingen. Diplômé en 1868, il commence sa carrière de médecin de campagne. Passionné depuis toujours par le monde qui l'entoure, il s'intéresse à l'archéologie, à l'anthropologie… et à un domaine tout nouveau dans le milieu scientifique : la bactériologie.
Consciencieux, méthodique et patient, il ne cesse de travailler et de rechercher la cause, encore mystérieuse, des maladies mortelles. Il invente plusieurs manières de cultiver les micro-organismes, il les isole, les colore, les observe, les manipule et les inocule à des hôtes sains. Il utilise l'agar comme agent solidifiant, par suite d'une proposition de sa collaboratrice Fannie Hesse, la boîte de Petri, récipient pour milieu de culture solide imaginé par son assistant, Richard Petri. Lorsque, en 1876, il démontre de manière irréfutable que la bactérie *Bacillus anthrax* observée dans le sang d'animaux « charbonneux » est l'agent responsable du charbon épidémique, il sort de l'ombre et devient membre de l'Office de la santé à Berlin. En 1882, il découvre la bactérie responsable de la tuberculose, ou bacille de Koch *(Mycobacterium tuberculosis)* et, en 1883, le vecteur du choléra *(Vibrio choleræ).* Reconnu alors dans le monde entier, il devient professeur à l'université de Berlin. De 1891 à 1904, il assure les fonctions de directeur de l'Institut des maladies infectieuses qu'il a fondé comme pendant de l'Institut Pasteur de Paris. Il meurt à Baden-Baden en 1910 après avoir obtenu le prix Nobel de médecine en 1905.



REBECCA CRAIGHILL LANCEFIELD (1895-1981) – En 1918, elle rejoint l'Institut Rockefeller pour la recherche médicale, débutant son étude des streptocoques hémolytiques, dénommés alors streptocoques *hæmolyticus.* Suivant la voie d'Oswald Avery, qui avait précédemment mis au point un système de sérum (ou précipitation) pour différencier parmi des types de *pneumococci,* elle démontre également que c'est un de ces groupes, les streptocoques A (pyogènes de S.), qui est spécifique aux humains et à la maladie humaine, y compris la pharyngite, la scarlatine, la fièvre rhumatismale, la néphrite et l'impétigo. En prouvant la base de la spécificité antigénique, R.C. Lancefield offre une explication du rôle de la protéine M dans le mécanisme, de la bactérie de la survie dans le contexte du centre serveur humain et de causer la maladie.



ANTONY VAN LEEUWENHOEK est né à Delft le 24 octobre 1632. À partir de 1654, il exerce le métier de marchand drapier. Aux environs de 1668, il réalise son premier microscope et commence ses observations. Il observe ainsi le premier les globules rouges du sang (1673), les bactéries (1683) et les protozoaires, les spermatozoïdes (1677), les cellules de la levure de bière (1680) et les capillaires (1689). Ses travaux ont un écho très large et contribuent à la découverte du monde du vivant.

Copyrighted material



ANDRÉ LWOFF (Ainay le Château, 1902-Paris, 1994) – Au cours de ses études de sciences et de médecine, André Lwoff commence sa vie scientifique à Roscoff, sous la direction d'Édouard Chatton. Il entre à 20 ans à l'Institut Pasteur, dans le laboratoire de Félix Mesnil.

En 1938, il est nommé chef du Service de physiologie microbienne. Dans le « grenier », il accueille Jacques Monod, Élie Wollman, Pierre Schaeffer et François Jacob.

Son œuvre scientifique est dominée par deux recherches majeures : d'une part, le statut et le rôle des facteurs de croissance et, d'autre part, la possibilité pour un virus, le bactériophage, de devenir un constituant génétique de la bactérie hôte. Ces découvertes font de lui l'un des fondateurs de la biologie moléculaire.

Avec François Jacob et Jacques Monod, ils reçoivent le prix Nobel de médecine en 1965 « pour leurs découvertes sur la régulation génétique de la synthèse des enzymes et des virus ».



JACQUES MONOD est né à Paris en 1910. En 1941, il soutint sa thèse de doctorat ès sciences sur la croissance bactérienne. Résistant pendant la Seconde Guerre mondiale, il vient souvent se réfugier à l'Institut Pasteur où, de 1945 à 1953, il dirige le Laboratoire de physiologie microbienne puis, en 1954, crée le Service de biochimie cellulaire. En 1959, il est nommé professeur à la faculté des Sciences de Paris. En 1965, il partage le prix Nobel de médecine avec F. Jacob et A. Lwoff pour ses travaux sur le contrôle de l'expression de l'information génétique. Avec F. Jacob également, il conçoit puis démontre la réalité de VARN messager. Titulaire de la chaire de biologie moléculaire au Collège de France en 1967, il devient directeur de l'Institut Pasteur en 1971. Il meurt à Cannes en 1976.



LOUIS PASTEUR naît le 27 décembre 1822 à Dole, dans le Jura. Il passe toute son enfance à Arbois où il fréquente l'école primaire et secondaire. En 1847, le titre de docteur ès sciences lui est conféré pour ses thèses de physique et de chimie consacrée à la cristallographie. Il est ensuite nommé professeur de chimie à l'université de Strasbourg. Tout au long de sa carrière, il réalise des recherches dans différents domaines (fermentation, conservation des aliments, maladie des vers à soie, maladies infectieuses, vaccination). Il connaît la renommée grâce à la technique de pasteurisation et à la vaccination contre la rage avant de s'éteindre le 28 septembre 1895 près de Paris.

À partir de 1854, il étudie le processus de la fermentation. Il refuse de croire à la théorie de la génération spontanée et prouve qu'il a raison, en 1862, grâce à l'expérience du ballon « à col-de cygne ».

Entre 1878 et 1880, il isole trois germes : le streptocoque, le staphylocoque et le pneumocoque. En 1880, il travaille sur le choléra des poules. En ce qui concerne la rage, il n'a pas réussi à isoler le micro-organisme responsable car le virus est beaucoup trop petit pour être vu grâce aux méthodes d'observation de l'époque. Après de nombreuses hésitations, il applique pour la première fois son vaccin antirabique à un jeune garçon, Joseph Meister, le 6 juillet 1885. À la demande de Napoléon 111, il recherche ensuite les causes possibles des altérations du vin. Il met au point une technique, la pasteurisation, qui consiste à chauffer le liquide quelques minutes à une température située entre 55 et 60°C. Elle est encore largement utilisée à l'heure actuelle pour la conservation du vin, de la bière, du lait, du beurre.

Copyrighted material



RICHARD PFEIFFER (1858-1945) – Médecin et biologiste allemand né à Zduny (Posnanie). De 1887 à 1891, il est assistant de R. Koch à l'Institut d'hygiène de Berlin.
En 1892, il isole le *Bacillus hæmophilus influenzæ* dans la gorge d'un malade, lors de l'épidémie de grippe de 1889-1892.
En 1896, il isole *Mierococcus catarrhalis.*
En 1898, il accompagne R. Koch en Italie pour des recherches sur la malaria.
Il est nommé professeur d'hygiène à l'université de Kônigsberg de 1899 à 1909 puis à celle de Breslau de 1909 à 1925.



GASTON RAMON (1886-1963) – Vétérinaire et biologiste français né à Bellechaume (Yonne). 1911-1920 : E. Roux l'affecte, en qualité de vétérinaire, au service de production des sérums. Il est chargé d'immuniser de très nombreux chevaux et de récolter des sérums antitétaniques, antidiphtériques, antigangréneux.
1915 : E. Roux lui demande de trouver un antiseptique propre à assurer, dans des conditions de guerre, une bonne conservation des immunosérums. Son choix se révélera excellent : le formol.
1921 : il met au point un procédé de purification des sérums antitoxiques qui va rendre les accidents sériques moins fréquents et moins sévères qu'avant.
1923 : il démontre que la toxine diphtérique, qui a subi l'action simultanée d'une petite quantité de formol et de la chaleur, se transforme en un dérivé inoffensif mais vaccinant. Il lui donne le nom d'anatoxine diphtérique. À la même époque, il indique que, d'après des principes identiques, la toxine tétanique peut, elle aussi, être transformée en anatoxine tétanique.
1924 : il montre qu'à partir des venins peuvent être obtenus des anavenins.
1925 : il instaure le principe des *substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité.* 1925-1926 : Application de l'anatoxine tétanique à la prévention du tétanos.
1926 : il instaure, avec C. Zoeller, la méthode des vaccinations associées. Cette technique est à la base de la conception du vaccin diphtérie-tétanos.
1929-1934 : en collaboration avec R. Debré, effectue des recherches biologiques et immunologiques concernant la diphtérie et la scarlatine.
1937-1940 : il est chargé de coordonner l'ensemble des services assurant la production des sérums et des anatoxines. Entre 1939 et 1940, l'Institut fournit 7 millions de doses de sérums et vaccins pour les armées.



FREDERICK SANGER est né le 13 août 1918 à Rendcombe, dans le Gloucestershire. Il obtient une licence en sciences naturelles en 1939. Depuis 1940, il est chercheur au département de biochimie de Cambridge. De 1940 à 1943, il travaille avec le Dr A. Neuberger sur le métabolisme de la lysine et obtient son doctorat en 1943. Depuis 1943, son travail concerne la détermination de la structure des protéines. C'est à lui qu'on doit la celle de l'insuline en 1955. Il est à présent directeur de la Division protéine du MRC Laboratory for Molecular Biology à Cambridge. Il établit la structure de la molécule d'insuline et obtient deux fois le prix Nobel de chimie en 1958 et 1980.

Copyrighted material



JAMES WATSON montre très tôt des aptitudes particulières pour les sciences. À 20 ans, en 1951, un doctorat de biochimie en poche et après une courte période postdoctorale passée au Danemark, il entre au laboratoire Cavendish de l'université de Cambridge (Angleterre). Il y rencontre le biophysicien **FRANCIS CRICK** qui, à 35 ans, prépare toujours sa thèse. Watson est séduit par le regard de physicien que Crick pose sur les problèmes de biologie. Ils décident tous deux de se consacrer à l'étude de l'ADN en se fondant sur les travaux de Maurice Wilkins, biophysicien néo-zélandais qui a montré, par cristallographie aux rayons X, que l'ADN est composé de structures en spirale se répétant. En 1953, Watson et Crick proposent un modèle de structure tridimensionnelle de l'acide désoxyribonucléique et imaginent du même coup le mécanisme qui régit la réplication de l'ADN. Un prix Nobel de médecine et de physiologie partagé avec Maurice Wilkins viendra consacrer leur œuvre, l'une des plus importantes de la biologie moderne, en 1962. De 1953 à 1956, Watson travaille au Californian Institute of Technology avant d'être nommé professeur à l'université de Harvard. De 1988 à 1992, il est nommé à la tête de l'ambitieux programme « Génome humain ». Il est actuellement président du Cold Spring Harbor Laboratory.

Après ses découvertes constituant le fondement de la biologie moléculaire, Crick se penche sur le déchiffrage du code génétique qui sera élucidé en 1966. Il se tourne ensuite vers la biologie du développement avant d'entrer en 1973 au Salk Institute for Biological Studies (Californie) pour participer à des recherches en neurobiologie.



SERGE WINOGRADSKY (1856-1953) – Biologiste français d'origine russe né à Kiev (Russie).

Il quitte l'université en 1884 avec un diplôme de docteur en sciences (botaniques) et séjourne quelque temps en Crimée où il installe un petit laboratoire pour ses recherches sur la morphologie des micro-organismes.

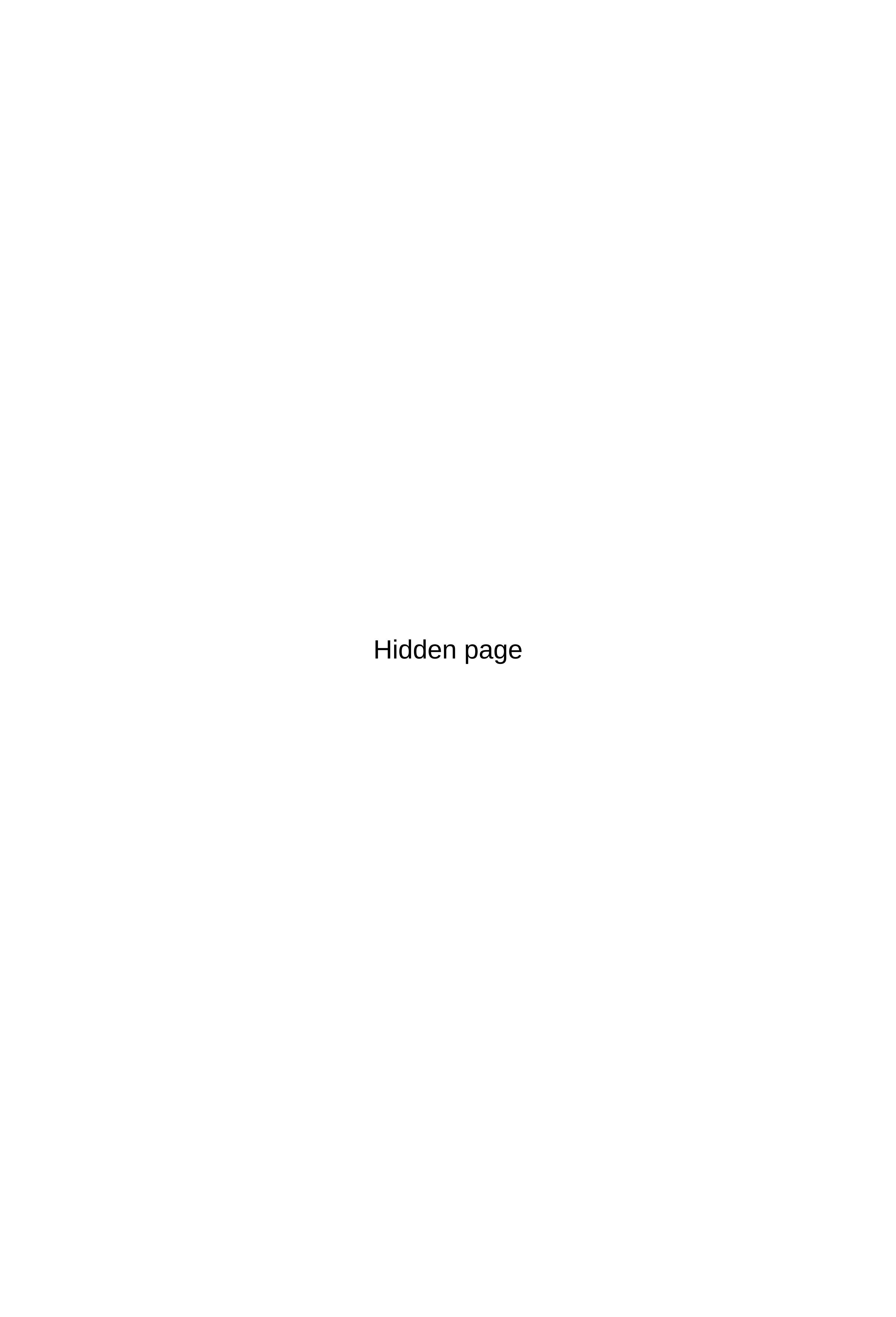
Il quitte la Russie de 1885 à 1888 pour entrer dans le Laboratoire de botanique de l'université de Strasbourg. Il y étudie les bactéries autotrophes, en particulier celles des eaux sulfureuses. Entre 1888 et 1891, il démontre que le groupe des bactéries nitrifiantes assimile l'acide carbonique par chimiosynthèse, mécanisme physiologique comparable à l'assimilation chlorophyllienne par photosynthèse. En 1890 et 1891, il publie une série de mémoires sur les bactéries sulfureuses, la nitrification et le pléomorphisme bactérien.

Il dirige l'Institut impérial de médecine expérimentale de Saint-Pétersbourg (1903-1905) où il étudie la fixation de l'azote atmosphérique par *Clostridium pastorianum*. Il rejoint l'Institut Pasteur en 1922 et investit la nouvelle filiale consacrée à l'étude de la microbiologie du sol.

De 1925 à 1941, il entreprend la rédaction d'une série de dix mémoires sur la microbiologie du sol, appliquant la méthode des gels de silice.

Copyrighted material

Hidden page


Hidden page

Hidden page

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

A. Meyer, J. Deiana, A. Bernard

Cours de microbiologie générale

avec problèmes et exercices corrigés

Cette nouvelle édition regroupe le *Cours de microbiologie générale* et les *Annales et exercices de microbiologie générale*, publiés à part lors de la précédente édition. Elle associe, de façon permanente, des données théoriques et épistémologiques à des applications pratiques au niveau du laboratoire et de l'industrie agroalimentaire. Ce cours permet ainsi d'établir un lien entre la microbiologie théorique et la pratique courante, y compris la sécurité au laboratoire. Il sert de base à la résolution des exercices et des problèmes présentés à la fin de chaque chapitre et suivis par les corrigés.
Des questions reprenant les compétences attendues par le programme permettent au lecteur de s'auto-évaluer.

Cet ouvrage s'adresse tout d'abord aux étudiants préparant le :

- BTS *Biotechnologie,*
- BTS *Bio-analyses et contrôles,*
- BTS *Analyses biologiques,*
- BTS *Métiers de l'eau,*
- BTS *Qualité dans les industries alimentaires et les bio-industries,*
- DUT *Biologie appliquée,*
- ainsi qu'à ceux des Classes préparatoires aux grandes écoles (CPEG TB).

Les étudiants préparant des DEUG et des licences de la filière *Biologie* y trouveront également les bases fondamentales de la microbiologie (avec des éléments de virologie et de mycologie).

Enfin, les élèves des classes terminales du baccalauréat technologique série STL (*Sciences et techniques de laboratoire*) spécialité « *Biochimie-Génie biologique* » y trouveront tous les éléments de leur programme.

ISBN : 2-7040-1170-2



Copyrighted material